Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Einfluß von Immunogen und Tracer auf die Spezifität eines Radioimmunotestes für D-Norgestrel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Beyer
Berlin

1976

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Einfluß von Immunogen und Tracer auf die Spezifität eines Radioimmunotestes für D-Norgestrel

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Beyer
Berlin

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

Korreferent: Professor Dr. T. Diamantstein

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18. 11. 76

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Dr. E. G e r h a r d s in den Forschungslaboratorien der Schering AG Berlin/Bergkamen durchgeführt.

Die fortlaufende Betreuung der Arbeit lag in den Händen von Herrn Diplom Ingenieur B. N i e u w e b o e r. Ihm und Herrn Dr. K. L ü b k e bin ich für die vielen wertvollen Anregungen und langen Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

1.	Einleitung	...1
1.1.	Grundlagen des radioimmunologischen Testes	...1
1.1.1.	Aufbau und Bildung der Immunglobuline	...2
1.1.2.	Die Antigen/Antikörper-Reaktion als Grundlage einer Testmethode	...5
1.2.	Problemstellung	..10
1.2.1.	Die Immunogene	..11
1.2.2.	Die Tracer	..13
2.	Anlage der Versuche	..15
2.1.	Material und Geräte	..15
2.2.	Synthese der Haptene	..16
2.2.1.	D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure	..16
2.2.2.	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronsäure	..17
2.3.	Synthese der Immunogene	..19
2.3.1.	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin	..19
2.3.2.	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G	..19
2.3.3.	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin	..20
2.3.4.	Charakterisierung der Immunogene	..20
2.3.4.1.	Aminogruppenbestimmung	..20
2.3.4.2.	UV-Spektren	..22
2.4.	Immunisierung	..22
2.5.	Synthese der Tracer	..24
3.	Durchführung der Versuche und Ergebnisse	..26
3.1.	Titerbestimmung	..26
3.2.	Bestimmung der Kreuzreaktionen	..28
3.2.1.	Zur Bestimmung der Kreuzreaktion eingesetzte Steroide	..28
3.2.2.	Bestimmung der Kreuzreaktion	..31
3.3.	Darstellung und Diskussion der Ergebnisse	..32
3.3.1.	Spezifität der Antiseren	..32
3.3.1.1.	Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Seren	..32
3.3.1.2.	Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Seren	..32
3.3.1.3.	Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Seren	..35
3.3.1.4.	Zusammenfassung	..35
3.3.2.	Vergleich der Kreuzreaktion verschiedener Antiseren	..37

3.3.2.1. Anti-D-NG-3-CMO-IgG-Serum und Anti-D-NG-3-CMO-RSA-Serum ..37
3.3.2.2. Anti-D-NG-3-CMO-RSA-Serum und Anti-D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA-Serum ..39
3.3.3. Vergleich der Kreuzreaktionen bei Verwendung verschiedener Tracer ..41
3.3.4. Vergleich der Kreuzreaktionen der Antiseren von dreimal und sechsmal geboosterten Tieren ..45
3.4. Schlußfolgerung und Zusammenfassung ..47

4. Literatur ..49

1. Einleitung

Der Wert einer Methode zur Bestimmung von Wirkstoffkonzentrationen in biologischem Material ist durch die Empfindlichkeit und die Spezifität dieser Methode gegeben.

Solange chemische Verfahren eingesetzt werden mußten, die auf der Reaktion bestimmter funktioneller Gruppen des Wirkstoffes mit dem Reagenz vorzugsweise unter Bildung eines Farbstoffes beruhen, war der Aufwand extrem groß. Die geringe Empfindlichkeit dieser Verfahren setzte die Aufarbeitung sehr großer Mengen an biologischem Material voraus. Die geringe Spezifität machte meistens vor der eigentlichen Bestimmung eine Abtrennung der zu messenden Verbindung erforderlich. Die Einführung von Fluoreszenz-Methoden, die in vielen Fällen eine 10 bis 100 mal größere Empfindlichkeit hatten, bedeutete einen ersten Fortschritt.

Im Jahre 1960 berichteten YALOW und BERSON über eine Bestimmung des Insulins im Plasma mit Hilfe von Insulin-Antikörpern. Dieses als 'Saturation Analysis' bezeichnete Verfahren war der Ausgangspunkt für die stürmische Entwicklung immunologischer Testmethoden, die heute in der medizinischen Forschung, vor allem in der Endokrinologie einen hervorragenden Platz unter den Analysenmethoden einnehmen. Durch die Verwendung radioaktiv markierter Reagenzien konnte bei extrem hoher Spezifität eine so hohe Empfindlichkeit erreicht werden, daß erstmals auch solche Substanzen bestimmt werden konnten, deren Konzentrationen in der Größenordnung von Picogramm pro Gramm oder Milliliter biologischen Materials liegen.

1.1. Grundlagen des radioimmunologischen Testes

Grundlage jedes immunologischen Testes ist die Fähigkeit höherer Organismen, nicht-körpereigene Fremdstoffe, die kleine Partikel (Bakterien, Viren, Blütenstaub etc.) oder große Moleküle (Proteine, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren) sein können, durch spezifisch gegen diese Fremdstoffe gerichtete Abwehrreaktionen unschädlich zu machen. Diese Fähigkeit beruht auf der Bildung von 'Antikörpern'. Diese sind kompliziert aufgebaute Proteine,

die in der Globulinfraktion des Plasmas vorkommen und daher Immunglobuline bezeichnet werden. Sie bilden mit den Fremdstoffen, die üblicherweise Antigene bezeichnet werden, einen nicht durch homöopolare Bindungen verknüpften Komplex.

1.1.1. Aufbau und Bildung der Immunglobuline

Der prinzipielle Aufbau der Immunglobuline konnte durch gezielten reduktiven und enzymatischen Abbau und Charakterisierung der entstandenen Spaltstücke ermittelt werden. Weitere Einblicke in die Struktur, die auch eine Erklärung der Klassifizierung auf molekularer Ebene ermöglichten, wurden durch erste Sequenzanalysen erhalten. Durch Reduktion von Disulfid-Brücken werden Antikörper in Peptidketten mit niedrigem Molekulargewicht (L-Ketten, light chains, Molekulargewicht ca. 25 000) und Ketten mit hohem Molekulargewicht (H-Ketten, heavy chains, Molekulargewicht ca. 50 000 bis 70 000) gespalten (EDELMAN 1965, Nobelpreis 1972). Aufgrund der bekannten Molekulargewichte der isolierten Ketten und dem des gesamten Immunglobulins (ca. 150 000) wurde von PORTER (1964, Nobelpreis 1972) ein aus zwei H-Ketten und zwei L-Ketten zusammengesetztes Strukturschema für ein Immunglobulin der Klasse G (Ig G) vorgeschlagen. Diese y-artige Form konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen und durch erste Röntgenstrukturanalysen bewiesen werden (Abb. 1). Ein Immunglobulin enthält zwei identische Bindungsstellen für das Antigen, die im N-terminalen Bereich der L- und H-Ketten liegen. Eine Folge dieser beiden Bindungsstellen ist, daß die Antigen/Antikörper-Reaktion im Falle kleiner Partikel oder hochmolekularer Verbindungen, die oft mehr als eine mit dem Antikörper reagierende Gruppierung haben, zur Ausfällung (Präzipitation) oder zur Verklumpung (Agglutination) des Komplexes führt. Mit weniger hochmolekularen Antigenen werden im allgemeinen lösliche Komplexe gebildet.

Die vorrangig an der Immunreaktion beteiligten Organe sind Lymphknoten, Milz und Knochenmark. Eine untergeordnete Rolle spielen Lunge und Leber. An der Immunglobulinsynthese sind zwei Zellreihen beteiligt. Zwei Drittel der antikörperproduzierenden Zellen gehören den Plasmazellen an, ein Drittel ent-

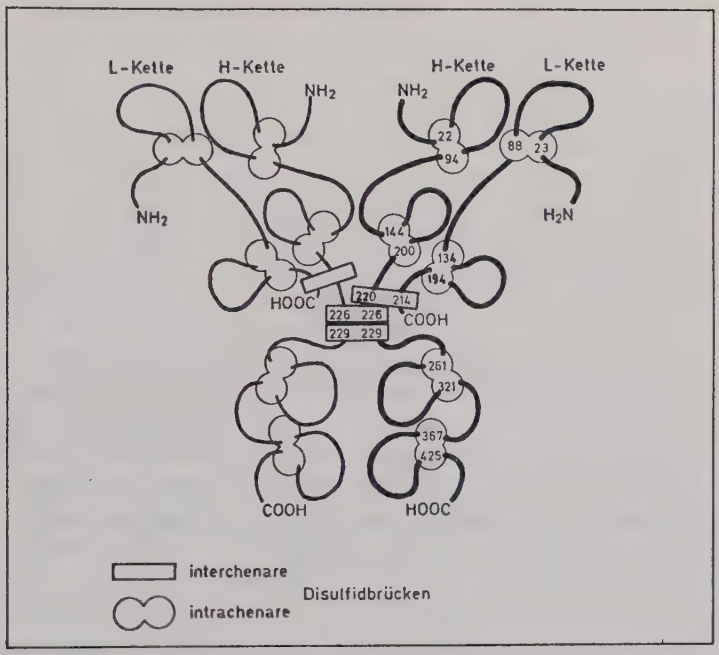


Abb. 1

stammt der Lymphozytenzellreihe. Ein wichtiges Charakteristikum der Zellen ist das endoplasmatische Retikulum und die assoziierten Ribosomen, das proteinsynthetisierende und -sezernierende Zentrum der Zelle.

Es gibt zur Zeit zwei Haupttheorien der Antikörperproduktion, die als Direktions- und Selektions-Theorie bezeichnet werden. Die bekannteste ist die Clonal-Selection-Theorie von BURNET. Nach der Direktions-Theorie wird das Immunogen als Matrize angesehen, das in eine immunglobulinproduzierende Zelle eindringen kann und hier die Aminosäuren dazu veranlaßt, sich dieser Schablone entsprechend zu ordnen, d.h., es resultiert die Synthese eines Moleküls, dessen räumliche Konfiguration die des Immunogens komplementiert.

Die Selektions-Theorie geht von der Existenz immunkompetenter, d.h. zur Antikörperproduktion fähiger Zellen aus. Die entsprechenden Immunogene selektieren aus den vorhandenen immunkompetenten Zellen die wenigen Zellen, die schon die Fähigkeit besitzen, die dem Immunogen spezifischen Antikörper herzustellen. Eine vereinfachte Vorstellung der zellulären Mechanismen zur Antikörperbildung ist, daß nach Applikation eines Immunogens entweder durch Kontakt mit lymphoiden Zellen (Lymphozyten) sich diese zu Plasmablasten entwickeln und über zwei weitere Stadien dann die reife Plasmazelle entsteht, die die Fähigkeit der Antikörperbildung besitzt. Der Kontakt findet z.B. im Lymphknoten an der Oberfläche spezieller Retikulumzellen statt, an die die Immunogene eingefangen werden, was auch 'Immunogen-trapping' genannt wird. Hier proliferieren und differenzieren sich die lymphoiden Zellen, es entstehen Keimzentren (Lymphknotenvergrößerung), von wo aus die Plasmazellen später emigrieren. Zum anderen können Immunogene, durch Makrophagen teilweise aufgespalten, zu den Lymphozyten transportiert werden (s. Abb. 2).

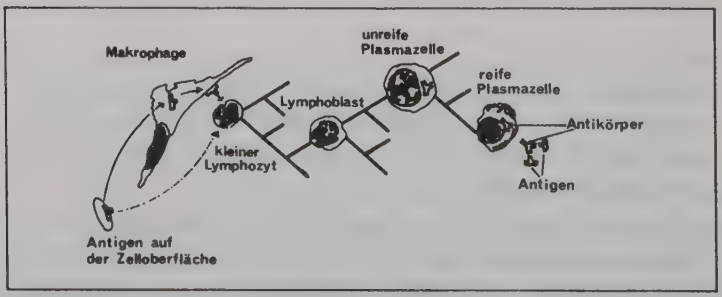


Abb. 2

In der Praxis wird die Gewinnung Antikörper enthaltenden Serums (häufig als Antiserum bezeichnet) wie folgt durchgeführt:
Die zur Antikörpergewinnung vorgesehenen Tiere (Kaninchen, Affen, Meerschweinchen, Schafe, Pferde o.ä.) erhalten zunächst eine Grundimmunisierung. In 30tägigen Abständen wird

weitere dreimal immunisiert. Diese Zweitimmunisierung wird auch Boosterung genannt. Durch den erneuten Kontakt mit dem gleichen Immunogen wird die Antikörperbildung beschleunigt und verstärkt. Im Gegensatz zur Antikörperbildung nach Grundimmunisierung, der Primärreaktion, wird der Boostereffekt Sekundärreaktion oder anamnestische Reaktion genannt, weil nach einer Primärreaktion sogenannte Gedächtniszellen (memory cells) existieren, die auf einen neuen gleichartigen Reiz schneller reagieren und proliferieren. Die Funktion solcher Gedächtniszellen scheinen kleine Lymphozyten auszuüben.

1.1.2. Die Antigen/Antikörper-Reaktion als Grundlage einer Testmethode

Um die Antigen/Antikörper-Reaktion als Grundlage eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Wirkstoffen zu verwenden, müssen Antikörper erzeugt werden, die möglichst spezifisch mit der zu bestimmenden Substanz einen Komplex bilden. Weiterhin muß die Antigen/Antikörper-Reaktion quantitativ messbar sein.

Die erste Voraussetzung ist im Falle von hochmolekularen Verbindungen als zu bestimmende Substanz erfüllt, da diese Verbindungen direkt den Organismus zur Antikörperbildung stimulieren können. Substanzen, die diese Eigenschaft haben, werden Immunogene genannt. Die auf diese Weise gebildeten Antikörper sind in ihrer Spezifität nicht gegen das Immunogen als Ganzes, sondern gegen bestimmte Bereiche, sogenannte determinante Gruppen,gerichtet. Proteine sind gute Immunogene und es ist verständlich, daß die Entwicklung immunologischer Teste mit der Bestimmung von Proteohormonen ihren Anfang nahm. Verbindungen niedrigen Molekulargewichtes (MG < 5 000) sind selbst nicht immunogen. Antikörper gegen diese Verbindungen können jedoch dadurch erhalten werden, daß man sie in Form eines geeigneten Derivates (Hapten) durch Kopplung an eine höhermolekulare Substanz, z.B. ein Protein, in ein Immunogen überführt. Die Haptene oder auch nur Teile von ihnen spielen die Rolle der determinanten Gruppen. Daraus folgt, daß die Antikörper nicht nur mit dem

gesamten Immunogen, sondern auch mit dem niedermolekularen Hapten reagieren (Abb. 3). Damit sind niedermolekulare Verbindungen, z.B. Peptidhormone, Aminosäuren und ihre Derivate wie Thyroxin, Adrenalin und Dopamin und nicht zuletzt auch Steroide und Steroidhormone diesem Verfahren zugänglich gemacht worden.

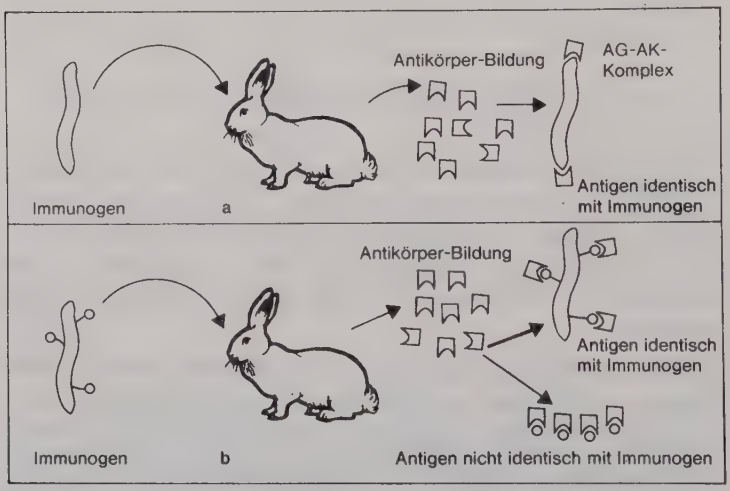


Abb. 3

Die Antigen/Antikörper-Reaktion folgt dem Massenwirkungsgesetz: Antigen (AG) + Antikörper (AK) $\rightleftharpoons$ Antigen/Antikörper-Komplex. Entsprechend der Lage dieses Gleichgewichtes werden immer freies Antigen und an den Antikörper gebundenes Antigen nebeneinander vorliegen. Um die Bindung zu messen, ist es daher erforderlich, freies und gebundenes Antigen zu trennen und danach entweder den freien oder den gebundenen Anteil zu bestimmen. Die Antigen/Antikörper-Reaktion läßt sich leicht messen, wenn das Antigen in radioaktiver Form eingesetzt wird. Nach Inkubation (Einstellung des Gleichgewichtes) und folgen-

der Abtrennung des nicht gebundenen Antigens zum Beispiel kann der Komplex leicht in einem Isotopenmeßgerät gemessen werden (Abb. 4).

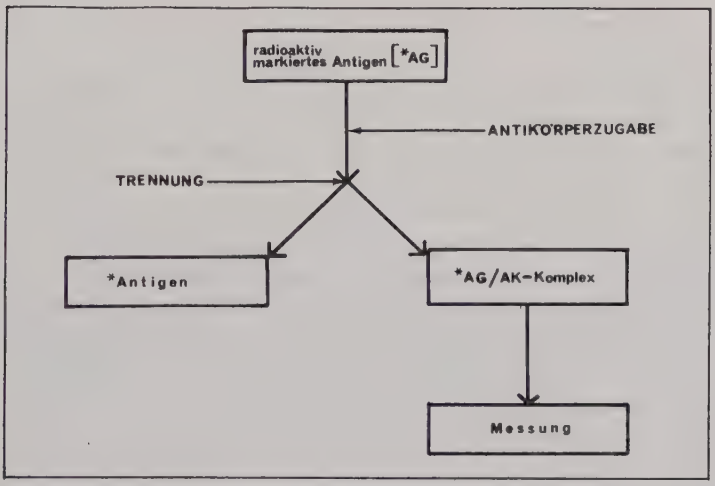


Abb. 4

Für den entscheidenden Schritt der Trennung von Antigen/Antikörper-Komplex und noch freiem Antigen sind mehrere Methoden beschrieben worden:

1. Der Gebrauch von Adsorbentien: z.B. Aktivkohle, Fuller's Erde, Talk, Zirconyl-Phosphat-Gel.
2. Die Ausfällung des Antigen/Antikörper-Komplexes z.B. mit Ammoniumsulfat
3. Elektrophoretische oder chromatographische Trennungen
4. Das Doppel-Antikörper-Verfahren, bei dem nach Bildung des Antigen/Antikörper-Komplexes ein zweiter Antikörper zugegeben wird, der den ersten Komplex ausfällt und damit die Trennung ermöglicht.
5. Der Solid-Phase-Immunotest, bei dem die Antikörper fest mit einem unlöslichen Träger, z.B. Sepharose, Polyacrylamid-Gele

oder der Wand des Reaktionsgefäßes verbunden sind. Nach der Zugabe des Antigens und der Inkubation kann leicht, z.B. durch Filtration, getrennt werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Trennung durch Adsorbentien vorgezogen. Von den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten wurde Aktivkohle gewählt, die das niedermolekulare freie Antigen bindet. Der Einsatz des radioimmunologischen Testes (engl. Radio Immuno Assay, RIA) als analytische Methode beruht auf der mehr oder weniger starken Verdrängung des in bekannter Menge zugesetzten radioaktiv markierten Antigens (Tracer) durch die zu untersuchende Substanz aus den Immunglobulinbinddungsstellen. Entsprechend den Prinzipien der 'Kompetitiven Proteinbindung' muß sichergestellt werden, daß keine unabgesättigten Antikörperbindungsstellen vorliegen, die das Ergebnis beeinflussen können. Es muß also im Sättigungsbereich gearbeitet werden (Abb. 5), der abhängig ist von der Konzentration der Antikörper im Antiserum und der im allgemeinen vorgegebenen Menge an zugesetztem Tracer. In der Praxis

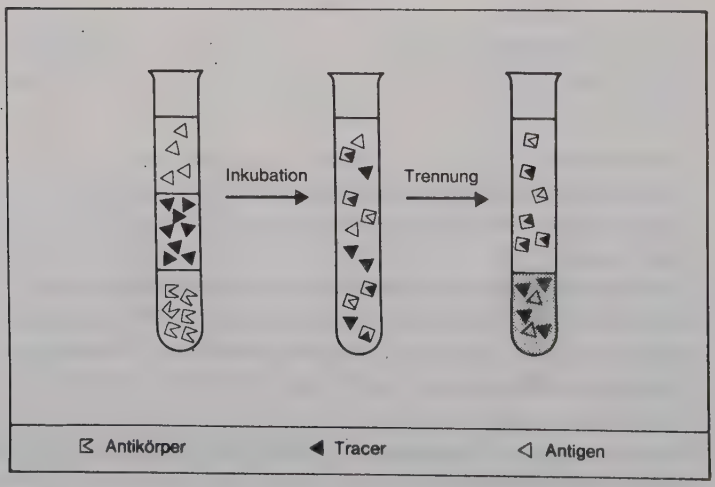


Abb. 5

wird daher das Arbeiten im Sättigungsbereich durch eine entsprechende Verdünnung des Antiserums erreicht. Der reziproke Wert der Verdünnung, bei der 50 % des zugegebenen Tracers gebunden werden, wird als Titer des Antiserums bezeichnet (Abb. 6).

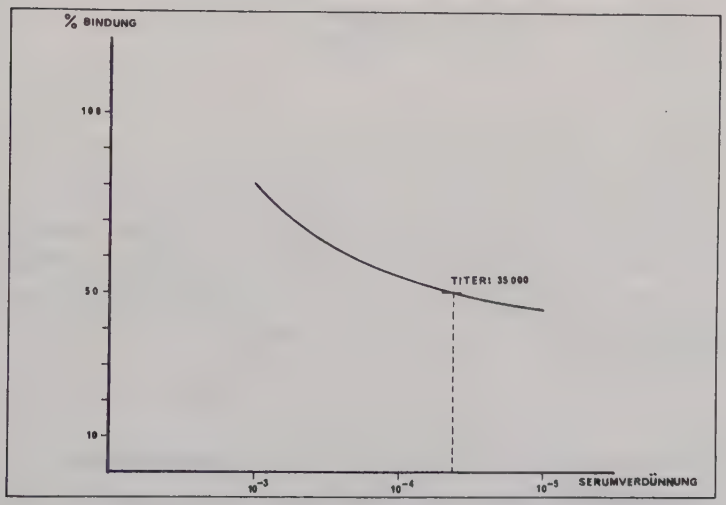


Abb. 6

Um die Spezifität der Antikörper zu erfahren, muß die Affinität von Substanzen ähnlicher Struktur im Vergleich zur Bezugssubstanz festgestellt werden. Zu diesem Zweck werden verschiedene Mengen dieser Substanz dem Tracer/Antikörper-System zugesetzt und die damit erreichte Reduktion der Bindung des Tracers gemessen. Eine Aussage über die Größe der Verdrängung wird durch den Vergleich mit einer Eichkurve erhalten, die in analoger Weise mit bekannten Mengen Bezugssubstanz erstellt wird (Abb. 7). Nach ABRAHAM wird die so ermittelte relative Affini-

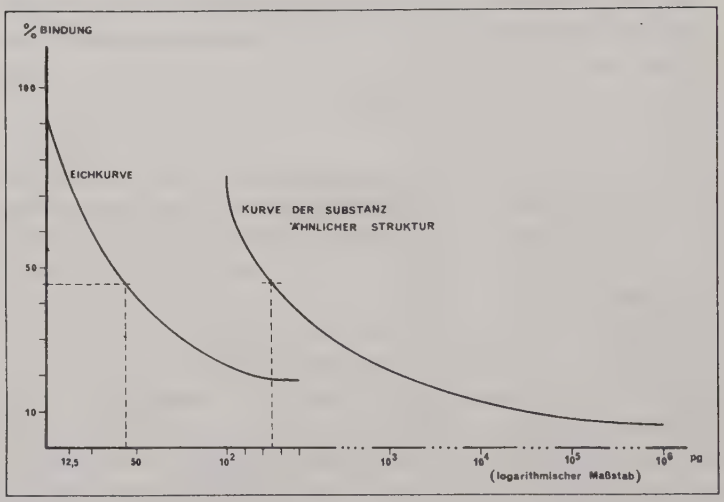


Abb. 7

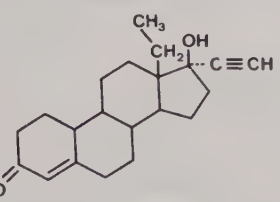
tät einer Substanz ähnlicher Struktur als Kreuzreaktion bezeichnet,und wie folgt definiert:

$$\% \text{ KREUZREAKTION} = \frac{\text{pg BEZUGSSUBSTANZ [bei 50\% Verdrängung]}}{\text{pg SUBSTANZ ähnlicher Struktur [bei 50\% Verdrängung]}} \cdot 100$$

1.2. Problemstellung

Im Rahmen der analytischen Biochemie spielen Radioimmunoteste für niedermolekulare Verbindungen eine immer größere Rolle. Da die zur Gewinnung geeigneter Antiseren verwendeten Immunogene nicht mit den später untersuchten Antigenen übereinstimmen, sind die Beziehungen zwischen der chemischen Struktur der Immunogene und der Spezifität der durch diese stimulierten

Antikörper von besonderem Interesse. Aufgabe dieser Arbeit war es, an dem Beispiel eines Steroids den Einfluß verschiedener Immunogene auf die Spezifität des Antiserums zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurde das synthetische Gestagen D-Norgestrel gewählt (Abb. 8).



D-17β-Hydroxy-18methyl-17α-äthinyl-4östren-3-on
D-Norgestrel (D-NG)

Abb. 8

Als Trägermoleküle, an die dieses Steroid als Hapten gekuppelt wurde, dienten Rinderserumalbumin (RSA, Mol. Gew. 67 000) und humanes Immunglobulin G (IgG, Mol. Gew. 150 000). Als weitere Modifizierung wurde das Steroid direkt und über eine Brücke mit dem Protein verknüpft. Eine weitere Aufgabe sollte die Untersuchung über den Einfluß des Tracers auf die Spezifität sein. Zu diesem Zweck wurden die Versuche mit zwei verschiedenen Tracern durchgeführt.

1.2.1. Die Immunogene

Die Verknüpfung von Steroid und Protein erfolgte immer über die Ketogruppe in Position C_3. Als geeignetes Hapten wurde die mit O-(Carboxymethyl)-hydroxylamin zugängliche D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure (D-Norgestrel-3-O-(Carboxymethyl)-oxim), im folgenden als D-NG-3-CMO bezeichnet, verwendet (Abb. 9). Dieses Steroid-Derivat wurde dann direkt über die freie Carboxy-Gruppe an die ε-Aminogruppen des Lysinrestes in dem entsprechenden Protein gekuppelt (Abb. 10). Auf diese Weise wurden erhalten:

D-17ß-Hydroxy-18-methyl-17α-äthinyl-4-östren-3-yliden-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-RSA)

D-17ß-Hydroxy-18-methyl-17α-äthinyl-4-östren-3-yliden-iminoglycolyl-Humanimmunglobulin G (D-NG-3-CMO-hIgG)

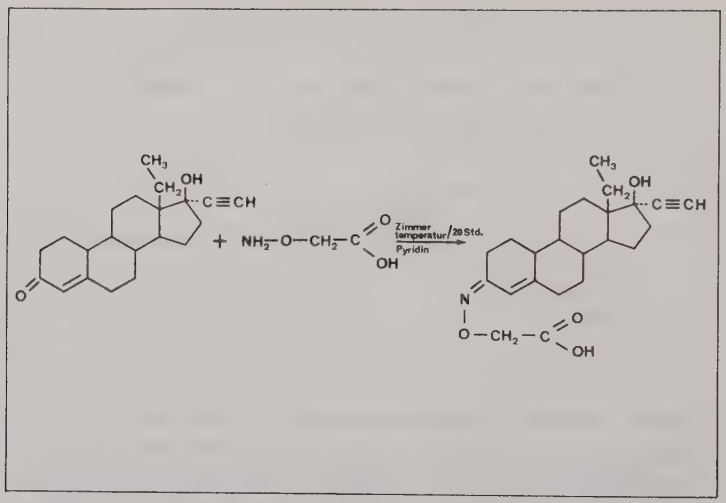


Abb. 9

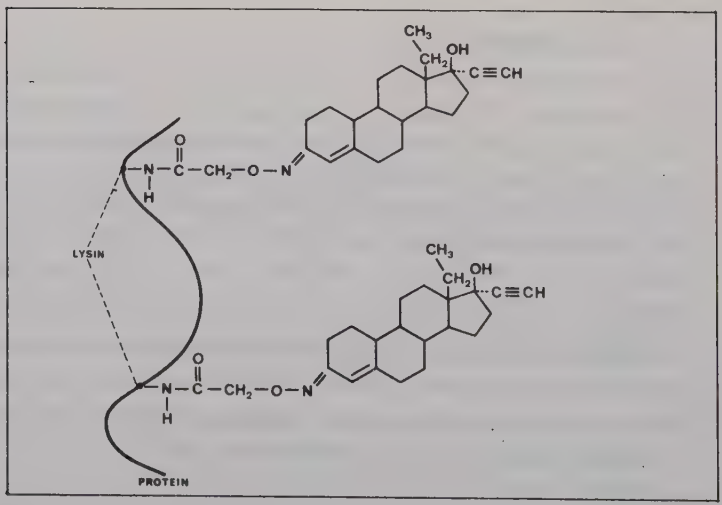


Abb. 10

Weiterhin wurde das Hapten zunächst mit ε-Aminocapronsäure zur D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronsäure umgesetzt und dieses Hapten dann an Rinderserumalbumin gekuppelt (Abb. 11):

17ß-Hydroxy-18-methyl-17α-äthinyl-4-östren-3-yliden-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA).

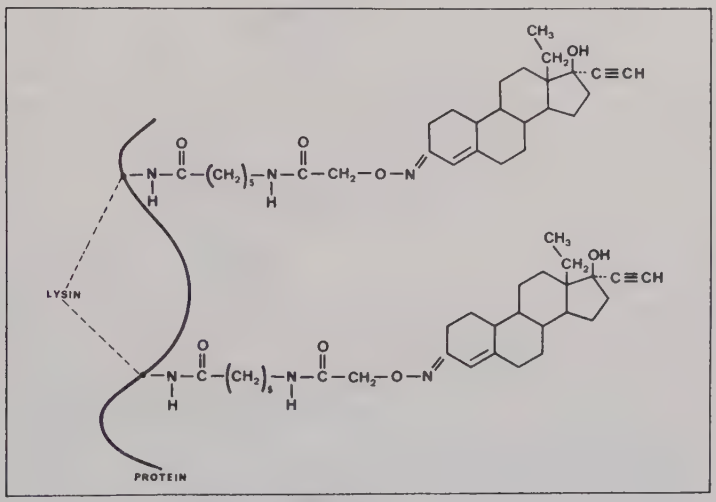


Abb. 11

1.2.2 Verwendete Tracer:

Da Norgestrel nicht in ausreichend hoch radioaktiv markierter Form zugänglich ist, wurden als Tracer, entsprechend einem Vorschlag von HUNTER, Norgestrel-^{125}J-Histaminderivate verwendet:

D-17ß-Hydroxy-18-methyl-17α-äthinyl-4-östren-3-yliden-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin (D-NG-3-CMO-^{125}jodhistamin, Abb. 12)

D-17ß-Hydroxy-18-methyl-17α-äthinal-4-östren-3-yliden-imino-

glycolyl-ε-aminocapronyl-^{125} jodhistamin (D-NG-3-CMO-ε-Acap-^{125} jodhistamin, Abb. 13)

Die Synthese dieser Verbindungen erfolgte durch Kupplung der D-Norgestrel-Derivate (D-NG-3-CMO und D-NG-3-CMO-ε-Acap) mit jodmarkiertem Histamin.

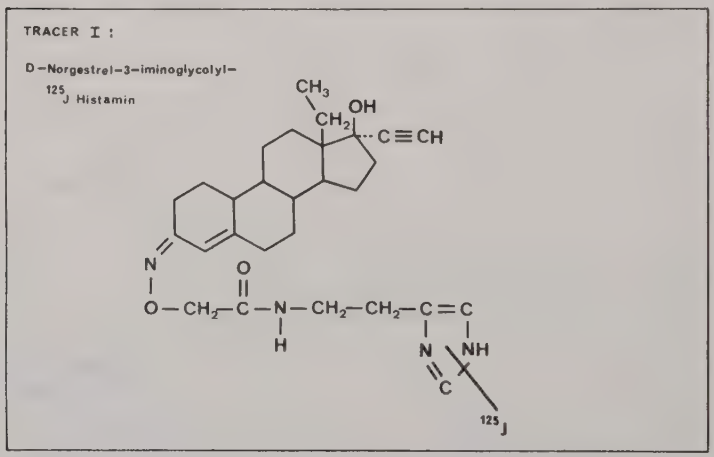


Abb. 12

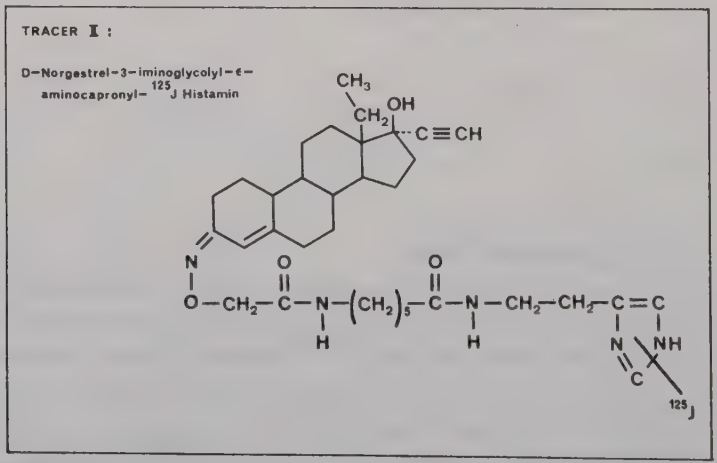


Abb. 13

2. Anlage der Versuche

2.1. Materialien und Reagentien

Lösungsmittel und Reagentien kamen in gereinigter Form (p. A.) zur Anwendung. An speziellen Materialien wurden verwendet: Freund'sches komplettes Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit), humanes Immunglobulin G-Cohn Fraktion II, lyophil rein (Serva), Histamin purum (Fluka-Buchs AG), ε-Aminocapronsäure und Aktivkohle (Merck), $Na^{125}J$, trägerfrei, spezifische Aktivität 100 mCi/ml (Amersham Buchler), Rinderserumalbumin reinst (Beringwerke), alle Steroide und deren Abkömmlinge s.S. 28-30 (Schering AG), Dextran T 70 und Sephadex G25 (Pharmazia, Uppsala), Dünnschichtchromatographie-Platten HF 254 (Merck), Alox-N-Platten(Macherly-Nagel und Co), Dünnschicht-Radioaktivitäts-Scanner (Berthold), Spektrophotometer DMR 10 (Zeiss), Isotopenmeßgerät-Gamma Counter / Auto-Gamma-Scintillationsspektrometer Modell 5285 (Packard / Fa. Nuclear Chicago).

Aktivkohle-Dextran-Suspension:

5 g Aktivkohle und 0,5 g Dextran T 70 in 1000 ml Puffer Nr. 4 suspendiert.

Systeme für Dünnschicht-Chromatographie:

System Nummer:	Lösungsmittel (Volumen-Verhältnis):
1.	Butanol : Eisessig : Wasser 75 : 13 : 12
2.	Methanol : Chloroform 1 : 1
3.	Benzol : Aceton 2 : 1
4.	Benzol : Eisessig : Wasser 10 : 10 : 1
5.	Benzol : Äthanol 75 : 24

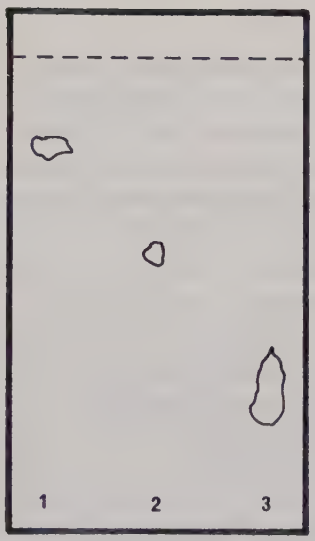
Pufferlösungen:

Puffer Nummer:	Zusammensetzung:
1.	Ammoniumhydrogencarbonat pH 9; 0,01 mol
2.	Natriumphosphat pH 8; 0,5 mol
3.	Natriumphosphat pH 7; 0,5 mol
4.	Phosphatpuffer 0,1 % an Albumin pH 7; 0,06 mol 18 g Natriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4x2H_2O$), 18 g Natriumchlorid, 7,1g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), 2 g Natriumazid (NaN_3) und 2 g Rinderserumalbumin in 2 l Wasser lösen

2.2 Synthese der Haptene

2.2.1 D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure (D-NG-3-CMO)

2 g (6,4 mMol) D-Norgestrel und 2,55g (20 mMol) Carboxymethoxylaminhemichlorid wurden in 20 ml Pyridin gelöst und 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen, mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und anschließend im Eisbad zweimal mit Diäthyläther extrahiert. Die Wasserphase wurde verworfen, die Ätherphase mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde in Tetrachlorkohlenstoff aufgenommen und mit n-Hexan gefällt. Nach dem Abfiltrieren wurde das Reaktionsprodukt im Exicator über Phosphorpentoxyd getrocknet.
Ausbeute: 1,62 g D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure.
Die Dünnschichtchromatographie in System 2 zeigt eine klare Trennung des D-NG-3-CMO von den Ausgangssubstanzen (Abb. 14).



1 D-Norgestrel

2 D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure

3 Carboxymethoxylaminhemichlorid

RF-Wert von 2 = 0,56

Abb. 14

2.2.2 N-(D-Norgestrel-3-iminoglycolyl)-ε-aminocapronsäure (D-NG-3-CMO-ε-Acap)

282 mg (1,43 mMol) Trichlorphenol und 296 mg Dicyclohexylcarbodiimid wurden in 10 ml THF gelöst, auf -10° C gekühlt und mit 500 mg (1,3 mMol) D-Norgestrel-3-CMO in 5 ml THF versetzt.

Die Lösung wurde 72 Stunden bei 0° C stehengelassen. Nachdem anschließend der gebildete Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Lösungsmittel abdestilliert war, wurde der Rückstand in Äther aufgenommen und mit 0,1 mol Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Ausbeute nach Einengen am Rotationsverdampfer: 773 mg D-Norgestrel-3-iminoglycolsäure-trichlorphenylester (D-NG-3-CMO-OPhCl$_3$). 700 mg (620 µMol) des Esters wurden in 8 ml Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 157 mg (1,2 mMol) ε-Aminosäure und 101 mg Natriumhydrogencarbonat, gelöst in 4 ml Wasser, wurde der Ansatz bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Lösung eingeengt und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Nach dem Ausschütteln mit Natriumhy-

drogencarbonat-Lösung und 10%iger Zitronensäure wurde mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingeengt. Ausbeute: 384 mg D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronsäure . Die Dünnschichtchromatographien in System 1 und 2 zeigten eine deutliche Trennung des Steroid-Derivates von den Ausgangsmaterialien.

System 1 (Abb. 15)

1 = D-NG-3-CMO
2 = D-NG
3 = D-NG-3-CMO-$OPhCl_3$
4 = D-NG-3-CMO-ε-Acap
5 = ε-Acap

RF-Wert von 4 = 0,72

System 2 (Abb. 16)

1 = D-NG-3-CMO
2 = D-NG-3-CMO-$OPhCl_3$
3 = D-NG-3-CMO-ε-Acap
4 = ε-Acap

RF-Wert von 3 = 0,34

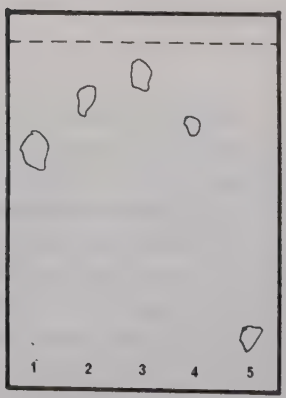


Abb. 15

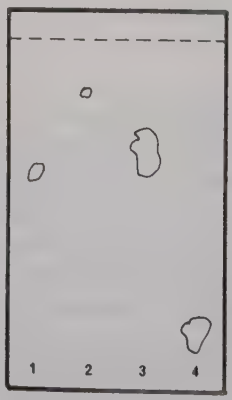


Abb. 16

2.3 Synthese der Immunogene

Die Carboxy-Gruppen-haltigen Steroid-Haptene wurden über die Methode der gemischten Säureanhydridean die Lysinreste in den entsprechenden Proteinen (Rinderserumalbumin und humanes Immunglobulin G) gekuppelt.

2.3.1 D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-RSA)

195,3 mg (500 µMol) D-NG-3-CMO wurden in 0,5 ml Dimethylformamid und 1,5 ml Hexamethylphosphorsäuretiamid (HMPT) gelöst. Bei -4° C wurde mit 632 µl 10%iger N-Äthylmorpholin-Lösung in HMPT und 676 µl 10%igem Chlorameisensäureisobutylester in HMPT versetzt. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 288 mg Rinderserumalbumin (entsprechend 250 µMol€-Aminogruppen), gelöst in einer Mischung von 2,4 ml Wasser, 800 µl 10%iger Äthylmorpholin-Lösung in HMPT und 7 ml HMPT. Viermal wurde mit 0,1 ml Wasser und ca. 0,5 ml HMPT nachgespült. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen, anschließend mit 60 ml Wasser verdünnt, mit 600 ml Aceton gefällt und 15 Minuten bei 2 500 x g zentrifugiert. Der Rückstand wurde zweimal mit Aceton gewaschen, zentrifugiert und im Exicator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Ausbeute: 286 mg D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin. Zur Reinigung wurde das Konjugat über Sephadex G 25 mit Puffer 1 chromatographiert. Da Sephadex G 25 eine Ausschlußgrenze von ca. 5000 Molekulargewicht hat, wird die Steroid-Albumin-Verbindung (MG 67 000) die Säule zuerst verlassen, während die niedermolekularen Substanzen vom Gel retardiert werden.

2.3.2 D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G (D-NG-3-CMO-hIgG):

186 mg (476,9 µMol) D-NG-CMO gelöst in 0,5 ml Dimethylformamid und 1,5ml HMPT wurden bei -4° C mit 603 µl 10%iger N-Äthylmorpholin-Lösung in HMPT und 650 µl 10%igem Chlorameisensäureisobutylester in HMPT versetzt. Nach 5 Minuten wurden 316 mg Immunglobulin G, gelöst in einer Mischung von 2,6 ml

Wasser, 7,7 ml HMPT und 735 µl 10% N-Äthylmorpholin (in HMPT) zugegeben. Nach der üblichen Aufarbeitung betrug die Ausbeute 86 mg D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G.

2.3.3. D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA)

249 mg (500 µMol) D-Norgestrel-3-CMO-ε-aminocapronsäure, gelöst in 0,5 ml Dimethylformamid und 3 ml HMPT, wurden nach Kühlung auf -4° C mit 632 µl 10%igem N-Äthylmorpholin (in HMPT) und 676 µl 10%igem Chlorameisensäureisobutylester (in HMPT) versetzt. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 288 mg Rinderserumalbumin (250 µMol ε-Aminogruppen), das zuvor in 2,4 ml Wasser, 7 ml HMPT und 800 µl 10%iger N-Äthylmorpholin-Lösung in HMPT gelöst war. Die Aufarbeitung erfolgte in üblicher Weise. Ausbeute: 330 mg D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin.

Die beiden Konjugate wurden anschließend gegen fließendes Wasser dialysiert, um noch vorhandene Ausgangsreagentien vom Konjugat zu trennen.

2.3.4 Charakterisierung der Immunogene

2.3.4.1 Aminogruppenbestimmung nach HABEEB:

1 mg Protein, bzw. Steroid Protein-Konjugat wird in 1 ml Wasser unter Zugabe von 1 ml 4%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und mit einer Lösung von 1 mg Trinitrobenzolsulfonsäure in 1 ml Wasser versetzt. Nach zweistündiger Reaktionszeit bei 40° C werden 1 ml 10%ige Laurylsulfatlösung zugegeben, die das Ausfällen nach Ansäuerung mit 0,5 ml 1 n Salzsäure verhindert. Anschließend wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 345 nm gegen eine Lösung von 1 mg Trinitrobezolsulfonsäure in 1 ml Wasser, 1 ml 4%ige Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 ml Wasser gemessen.
Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion (Meßlsg.)} \cdot \text{Gesamtvolumen (Meßlsg.)} \cdot 10^3}{\text{molare Extinktion} \cdot \text{Einwaage (Meßlsg. - mg/ml)}} = \mu\text{Äqu}\,NH_2/\text{mg SUBSTANZ}$$

(TNP-Gruppe = 10 000)

Das Immunglobulin G und sein Konjugat (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl Immunglobulin G) wurden durch die Bestimmung der ε-Aminogruppen charakterisiert. Zu diesem Verfahren werden die ε-Aminogruppen durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNP) umgesetzt. Nach hydrolytischer Abspaltung erfolgt dann die Messung der Extinktion der ε-TNP-Aminosäuren im UV-Bereich. Die Berechnung ist analog der der Aminogruppenbestimmung nach HABEEB.

SUBSTANZ	µÄqu NH_2/mg (Peptid,bzw.Konjugat)	=	freie NH_2/Mol (Peptid,bzw. Konjugat)
Rinderserumalbumin	0,82		56
D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin	0,25		20
D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin	0,20		18
Immunglobulin G	0,52		78
D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G	0,42		63

Die Aminogruppenbestimmung ergab für das humane Immunglobulin G mit 78 freien NH_2-Gruppen pro Mol Peptid erwartungsgemäß die höchste Anzahl Aminogruppen. Bei den Konjugaten zeigt sich, daß das Rinderserumalbumin-Konjugat mit Brücke die meisten Ste-

roidderivate gekuppelt hat, im Gegensatz zum Immunglobulin-Konjugat, das noch 63 freie Aminogruppen pro Mol Peptid aufwies. Ein Grund könnte die tertiäre Struktur des Proteins sein.

2.3.4.2 UV-Spektren

Die Spektren der Proteine (Rinderserumalbumin und humanes Immunglobulin G) und der entsprechenden Konjugate sind in Abb. 17, 18 und 19 wiedergegeben. Zur Messung wurden Rinderserumalbumin und seine beiden Konjugate (D-Norgestrel-3-CMO-RSA und D-Norgestrel-3-CMO-ε-aminocapronyl-RSA) in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst. Die Lösung des Immunglobulins und des D-Norgestrel-3-CMO-IgG erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung, Konzentration 1 mg/2 ml, bzw. 1 mg/4 ml.

2.4. Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte an insgesamt 11 Kaninchen ('Weiße Neuseeländer'). Jeweils drei, bzw. vier Kaninchen wurden mit einem Immunogen immunisiert:

Gruppe A Kaninchen 1-4	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-humanes Immunglobulin G (D-NG-3-CMO-hIgG)
Gruppe B Kaninchen 1-4	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-RSA)
Gruppe C Kaninchen 1-3	D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin (D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA)

Zur Herstellung der Immunisierungs-Lösung wurden 1 mg des entsprechenden Immunogens in 0,6 ml 1 mol Natriumchlorid-Lösung und 1,4 ml kompletten Freund'schen Adjuvans gelöst. Das Adjuvans, eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit Mycobakterien, wurde gegeben, um durch eine unspezifische Stimulierung der Immunantwort eine stärkere Antikörperbildung zu erreichen. Da sich die Immunogene nur schwer lösten, wurde mit Hilfe von Ultraschall

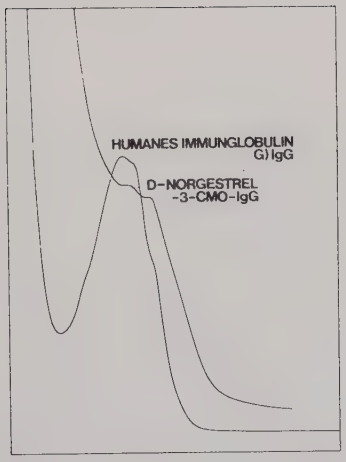


Abb. 17

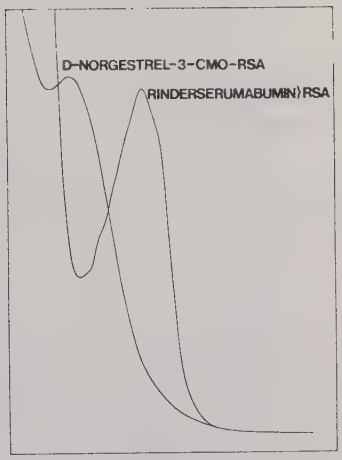


Abb. 18

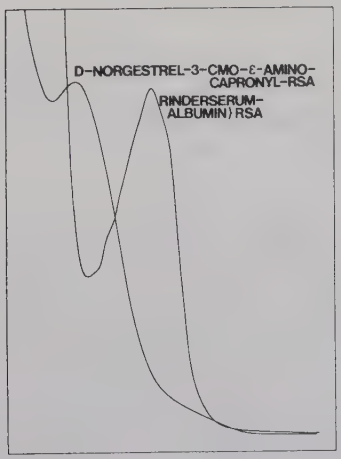


Abb. 19

eine injizierbare Suspension bereitet. Jedes Tier erhielt 2 ml dieser Suspension über den Rücken verteilt intracutan injiziert.

Blutabnahme:

Nach der 3. Boosterung erfolgte die Blutabnahme. Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurde die in der Ohrmitte der Tiere verlaufende Arterie 'punktiert'. Um ein Nachbluten aus der Wunde zu verhindern, wurde blutstillende Watte auf die entsprechenden Stelle gebracht. Das abgenommene Blut wurde anschließend 15 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, um das die Antikörper enthaltende Serum (Antiserum) zu gewinnen. Das Serum wurde, in einer Stammlösung mit Puffer Nr. 4 1:100 verdünnt, bis zur weiteren Verarbeitung bei einer Temperatur von +4°C gelagert.

2.5. Synthese der Tracer

Zur Herstellung der Tracer wurde Natrium ^{125}jodid verwendet. Nach der Jodierung wurde das erhaltene Mono ^{125}jodhistamin an die entsprechenden Steroid-Derivate (D-NG-3-CMO und D-NG-3-CMO-ε-Acap) gekuppelt.

Jodierung:

Zu 2 mCi Na ^{125}J (20 µl) wurden 10 µl Histamin-Lösung (2,22 mg gelöst in 10 ml Puffer Nr. 3), 10 µl Chloramin T-Lösung (5 mg in 1 ml Wasser) und nach 45 sec. 10 µl Natriummetabisulfit - Lösung (30 mg in 1 ml Wasser) gegeben.

Kupplung:

7 µMol Steroid-Derivat (2,5 mg D-NG-3-CMO bzw. 3,6 mg D-NG-3-CMO-ε-Acap) wurden bei 10° C mit 10 µl Tri-n-butylamin-Lösung (1:5 in Dioxan) und 10 µl Isobutylchloroformat-Lösung (1:10 in Dioxan) versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 10° C wurden 3,5 ml kaltes Dioxan zugegeben. Für die Kupplung wurden 50 µl dieses Reaktionsgemisches in ein Schliffröhrchen pipettiert und die Mono ^{125}jodhistamin-Lösung dazugeben. Anschließend wurden 10 µl 0,2 n Natronlauge hinzugefügt und eine Stunde bei 0° C inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 10 µl 0,2 n Natronlauge und weiterer einstündiger In-

kubation wurde mit 0,9 ml 0,1 n Salzsäure versetzt und mit 1 ml Toluol extrahiert und die organische Phase verworfen. Anschließend wurden dem Kupplungsgemisch 0,45 ml Wasser, 0,9 ml 0,1 n Natronlauge und 1 ml Natriummetabisulfit-Lösung (2 mg in 2 ml Puffer Nr. 2) zugegeben und das Steroid-^{125}Jodhistamin-Derivat mit 0,5 ml Toluol extrahiert. 10 µl dieser Tracer-Lösung hatten eine Aktivität von ca. 8 x 10^6 cpm (Counts per minute, Impulse pro Minute).

Chromatographie des Tracers:

Um eine Trennung der Steroid-^{125}Jodhistamin-Derivate von den Ausgangsmaterialien zu erreichen, wurden jeweils 100 µl der entsprechenden Lösung auf einer Alox-N-Platte im System Nr. 5 chromatographiert. Nach Trocknung wurde der Tracer auf der Platte durch einen Dünnschicht-Radioaktivitäts-Scanner lokalisiert (Abb. 20) und anschließend mit 5 ml Methanol von der Dünnschichtplatte eluiert. Nach dem Verdampfen des Methanols in einem Stickstoff-Strom wurde in soviel Puffer Nr. 4 gelöst, daß die Lösung eine Radioaktivität von 20 000 cpm/0,1 ml hatte. Bis zur weiteren Verwendung wurde sie bei + 4° C aufbewahrt.

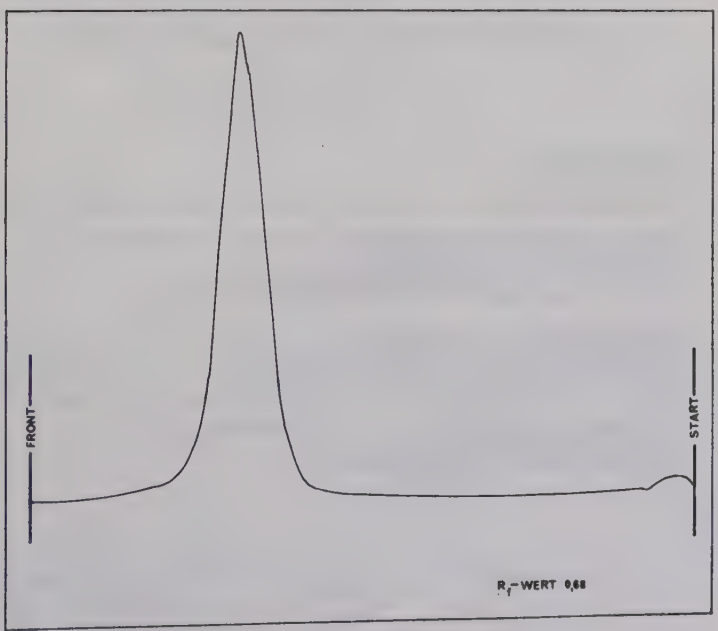


Abb. 20

3. Durchführung der Versuche und Ergebnisse

3.1. Titerbestimmung

Das folgende Schema zeigt den Ablauf einer Titerbestimmung.

Gesamtradioaktivität (RA, 2 Proben)	Kohle/Leerwert (CO, 2 Proben)	Serum-Verdünnung (2 Proben)
100 µl Puffer Nr. 4	100 µl Puffer Nr. 4	100 µl Puffer Nr. 4
+	+	+
200 µl Puffer Nr. 4	200 µl Puffer Nr. 4	200 µl Antiserum in den Verdünnungen 1, 10, 100 ng
+	+	+
100 µl Tracer = 20000 cpm	100 µl Tracer = 20000 cpm	100 µl Tracer = 20000 cpm
auf Whirlmix gemischt - 15 Stunden Inkubation bei +4° C		
+	+	+
500 µl Puffer Nr. 4	500 µl Dextran-Aktivkohle-Gemisch	500 µl Dextran-Aktivkohle-Gemisch
auf Whirlmix gemischt - 15 Minuten bei +4° C stehengelassen - 15 Minuten zentrifugiert (2 500 x g, +4° C)		
500 µl des Überstandes abgenommen		
1 Minute Messung im Gamma-Counter		

Die Bindung des Tracers bei den verschiedenen Serum-Verdünnungen wurde in Prozent der Gesamtradioaktivität berechnet:

$$\%\,\text{BINDUNG} = \frac{\text{cpm SERUM–PROBE} - \text{cpm CO}}{\text{cpm RA}} \cdot 100$$

Die Ergebnisse der Titerbestimmung sind in Abb. 21 zusammengestellt. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Antiseren so verdünnt, daß ca. 70 % des in konstanter Menge zugesetzten Tracers (20 000 cpm) gebunden wurden.

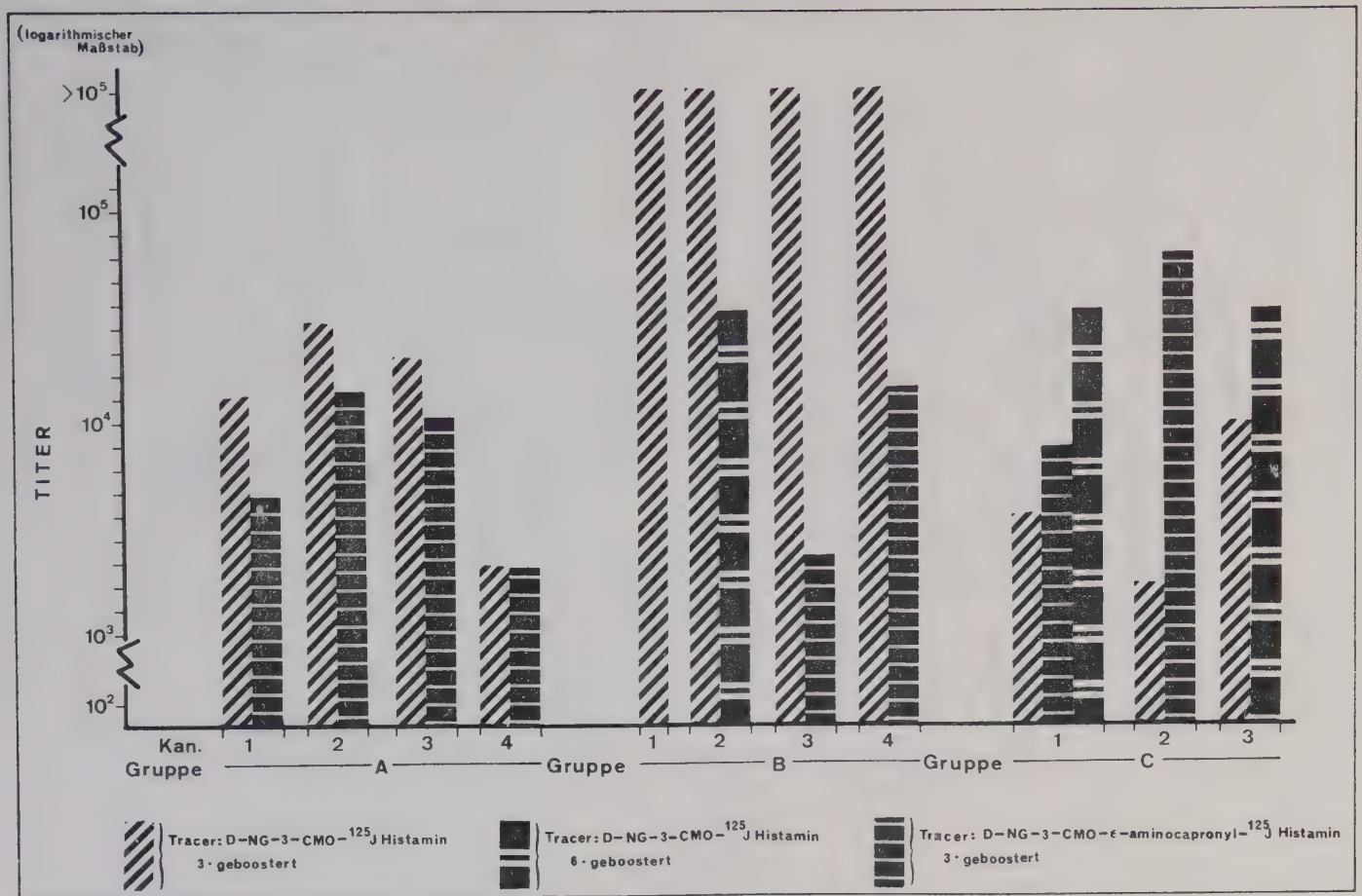

(logarithmischer Maßstab)
>10^5
10^5
10^4
10^3
10^2
TITER
Kan. Gruppe
1
2
3
4
A
Gruppe
1
2
3
4
B
Gruppe
1
2
3
C
Tracer: D-NG-3-CMO-125J Histamin
3-geboostert
Tracer: D-NG-3-CMO-125J Histamin
6-geboostert
Tracer: D-NG-3-CMO-ε-aminocapronyl-125J Histamin
3-geboostert

Abb. 21

Diskussion:

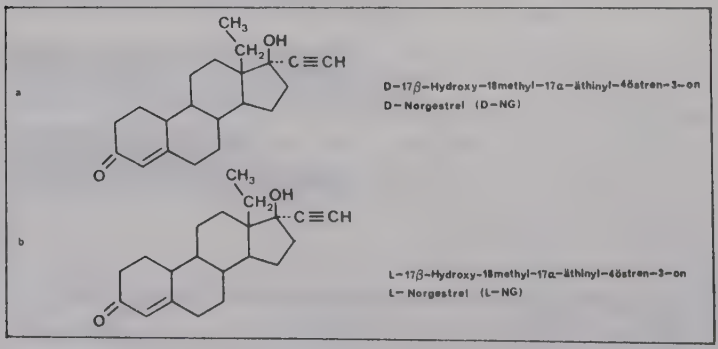
Gruppe B (Anti-D-NG-3-CMO-RSA-Serum) zeigt vermutlich deshalb den höchsten Titer, weil das Immunogen, mit dem die Tiere dieser Gruppe immunisiert wurden, die meisten Haptene enthielt (36 Mol Haptene/Mol Peptid). Entsprechend niedriger sind dann auch die Titer der Gruppe A (Anti-D-NG-3-CMO-hIgG-Serum) und der Gruppe C (Anti-D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA-Serum).

Wird die Titerbestimmung mit dem zweiten Tracer (D-NG-3-CMO-ε-Acap-^{125}jodhistamin) durchgeführt, steigt auch der Titer der Gruppe C. Mit dem Tracer, der eine analoge Struktur wie das zur Antikörper-Stimulation eingesetzte Immunogen besitzt, werden also mehr Typen der gebildeten Antikörper erfaßt. Auffallend ist weiter, daß bei einer mehrmaligen Boosterung (sechsmal anstatt dreimal) ein Titeranstieg nur bei der Gruppe C, die einen niedrigen Titer hat, nicht aber bei der schon mit ihrem Titer sehr hoch liegenden Gruppe B zu erkennen ist.

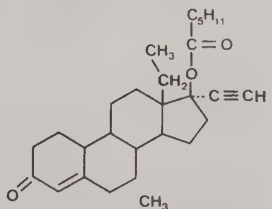
3.2. Bestimmung der Kreuzreaktionen

3.2.1. Zur Bestimmung der Kreuzreaktion eingesetzte Steroide

Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wurden ausschließlich solche Steroide eingesetzt, die strukturelle Ähnlichkeiten mit D-Norgestrel haben. Dies waren neben dem L-Norgestrel und einem D-Norgestrel-17-Ester vor allem im A-Ring reduzierte Derivate, die in vivo als Norgestrel-Metaboliten vorkommen, sowie Norethisteron, das sich vom Norgestrel durch die fehlende 18-Methylgruppe unterscheidet und seine Derivate. Schließlich wurden auch Äthinylöstradiol, Testosteron und 19-Nortestosteron verwendet:

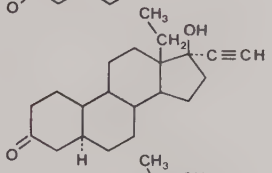


c



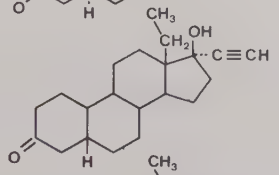
17β-Hexanoyloxy-18methyl-17α-äthinyl-4östren-3-on
D-Norgestrel-capronat

d



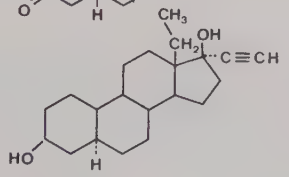
17β-Hydroxy-18methyl-17α-äthinyl-5α-östran-3-on
5α-Dihydro-Norgestrel

e



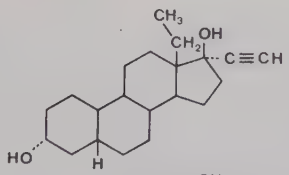
17β-Hydroxy-18methyl-17α-äthinyl-5β-östran-3-on
5β-Dihydro-Norgestrel

f



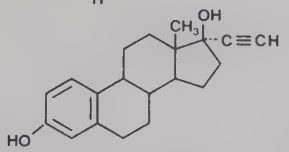
18Methyl-17α-äthinyl-5α-östran-3β,17β-diol
3β, 5α-Tetrahydro-Norgestrel

g



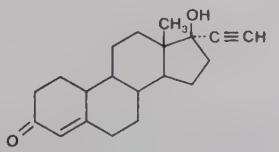
18Methyl-17α-äthinyl-5β-östran-3α-17β-diol
3α, 5β-Tetrahydro-Norgestrel

h



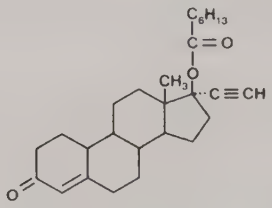
17α-Äthinyl-1,3,5(10)östradien-3β,17β-diol
Äthinylöstradiol

i



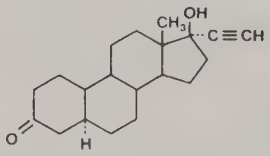
17β-Hydroxy-17α-äthinyl-4östren-3-on
Äthinylnortestosteron, Norethisteron (NET)

k



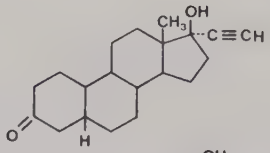
17β-Heptanoyloxy-4östren-3-on
17α-Äthinyl-Norethisteron-önantat

l



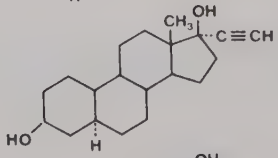
17β-Hydroxy-17α-äthinyl-5α-östran-3-on
5α-Dihydro-Norethisteron

m



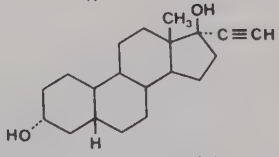
17β-Hydroxy-17α-äthinyl-5β-ostran-3-on
5β-Dihydro-Norethisteron

n



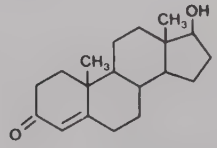
17α-Äthinyl-5α-östran-3β,17β-diol
3α,5α-Tetrahydro-Norethisteron

o



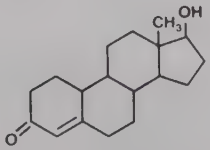
17α-Äthinyl-5β-östran-3α,17β-diol
3α,5β-Tetrahydro-Norethisteron

p



17β-Hydroxy-4 androsten-3-on
Testosteron

r



17β-Hydroxy-4östren-3-on
19-Nortestosteron

3.2.2. Bestimmung der Kreuzreaktion

Das folgende Schema zeigt den Ablauf einer Bestimmung der Kreuzreaktionen

Gesamtradioaktivität (RA, 2 Proben)	Kohle/Leerwert (CO, 2 Proben)	Eichkurve, Bezugssubstanz (2 Proben)	Vergleichssubstanz (2 Proben)
100 µl Puffer Nr. 4	100 µl Puffer Nr. 4	100 µl Puffer Nr. 4, mit 500, 300, 200, 100, 50, 25, 12,5, 0,0 pg D-Norgestrel	100 µl Puffer Nr. 4, mit 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 pg (Steroide ähnlicher Strukturen)
+	+	+	+
200 µl Puffer Nr. 4	200 µl Puffer Nr. 4	200 µl Antiserum	200 µl Antiserum
+	+	+	+
100 µl Tracer = 20000 cpm	100 µl Tracer = 20000 cpm	100 µl Tracer = 20000 cpm	100 µl Tracer = 20000 cpm
auf Whirlmix gemischt - 15 Stunden Inkubation bei +4° C			
+	+	+	+
500 µl Puffer Nr. 4	500 µl Dextran-Aktivkohle	500 µl Dextran-Aktivkohle	500 µl Dextran-Aktivkohle
auf Whirlmix gemischt - 15 Minuten bei +4° C stehengelassen - 15 Minuten zentrifugiert (2 500 x g, 4° C)			
500 µl des Überstandes abgenommen			
1 Minute Messung im Gamma-Counter (cpm)			

3.3. Darstellung und Diskussion der Ergebnisse

In den folgenden Abbildungen bezeichnen die kleinen lateinischen Buchstaben die entsprechenden Steroide, mit denen die Kreuzreaktionen durchgeführt wurden. Angegeben ist außerdem, mit welchem Immunogen das Antiserum erhalten und welcher Tracer eingesetzt wurde. Da die Kreuzreaktionen fast immer unter 10 % liegen, ist für die graphischen Darstellungen der logarithmische Maßstab gewählt worden.

3.3.1. Spezifität der Antiseren

3.3.1.1. Spezifität der Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Seren

Die Ergebnisse sind in Abb. 22 zusammengestellt. Bei allen Seren fallen die niedrigen Kreuzreaktionen mit dem L-Isomeren (b) und mit den 17-Estern (c,k) auf. Antiserum Nr. 3 zeigt geringe Unterschiede in seinen Kreuzreaktionen, die vielleicht durch den frühen Tod des Versuchstieres vor Ablauf der 3. Boosterung zu erklären sind. Die anderen Antiseren zeigen als weitere Gemeinsamkeiten eine deutliche Affinität der Antikörper für die Metaboliten 5α-Dihydro-, 5ß-Dihydro- und 5α,3ß-Tetrahydro-Norgestrel (d,e und f) sowie für Norethisteron (i) und 5α-Dihydro-Norethisteron (l). Dies ist insofern verständlich, als sowohl Immunogen als auch Tracer über die 3-Keto-Gruppe gekuppelt sind und damit die Erkennbarkeit von Unterschieden in diesem Bereich durch die Antikörper reduzieren.

3.3.1.2. Spezifität der Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Seren

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 zusammengestellt. Auch in dieser Gruppe fallen die niedrigen Kreuzreaktionen mit L-Norgestrel und dem D-Norgestrel-17-capronat (b,c) auf. Die Aussagen sind weniger einheitlich als in der Gruppe A. Extrem hohe Kreuzreaktionen (bis zu 20 %) wurden mit den 5α- und 5ß-Derivaten des Norgestrels (d,e) und mit Norethisteron (i) erhalten.

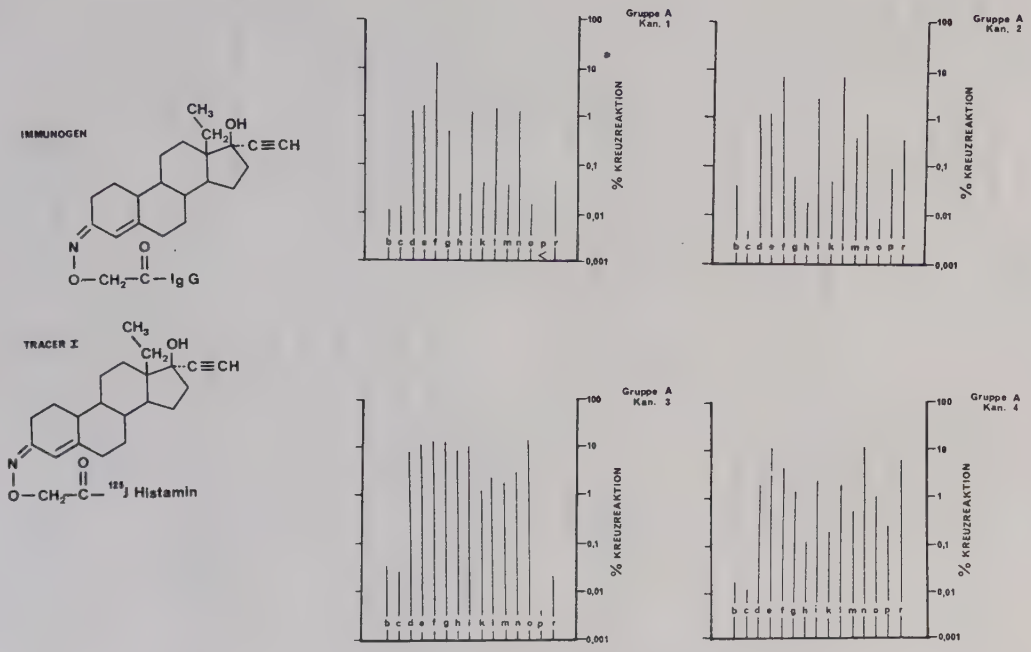
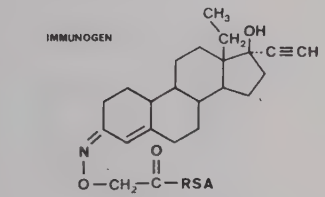
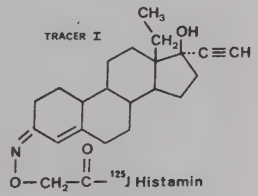
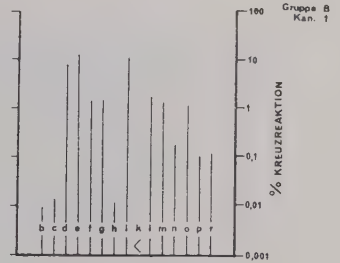
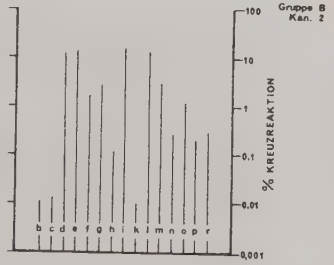

IMMUNOGEN
TRACER I
Ig G
^{125}J Histamin
Gruppe A
Kan. 1
Gruppe A
Kan. 2
Gruppe A
Kan. 3
Gruppe A
Kan. 4
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

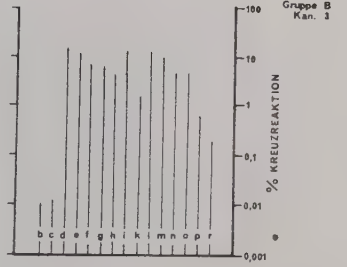
Abb. 22


IMMUNOGEN
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—RSA


TRACER I
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—125J Histamin


Gruppe B
Kan. 1
100
10
1
0,1
0,01
0,001
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r


Gruppe B
Kan. 2
100
10
1
0,1
0,01
0,001
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r


Gruppe B
Kan. 3
100
10
1
0,1
0,01
0,001
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r

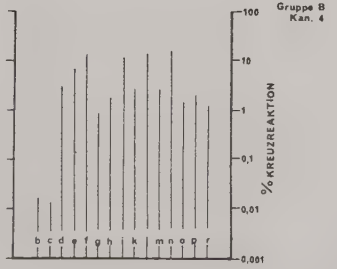

Gruppe B
Kan. 4
100
10
1
0,1
0,01
0,001
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r

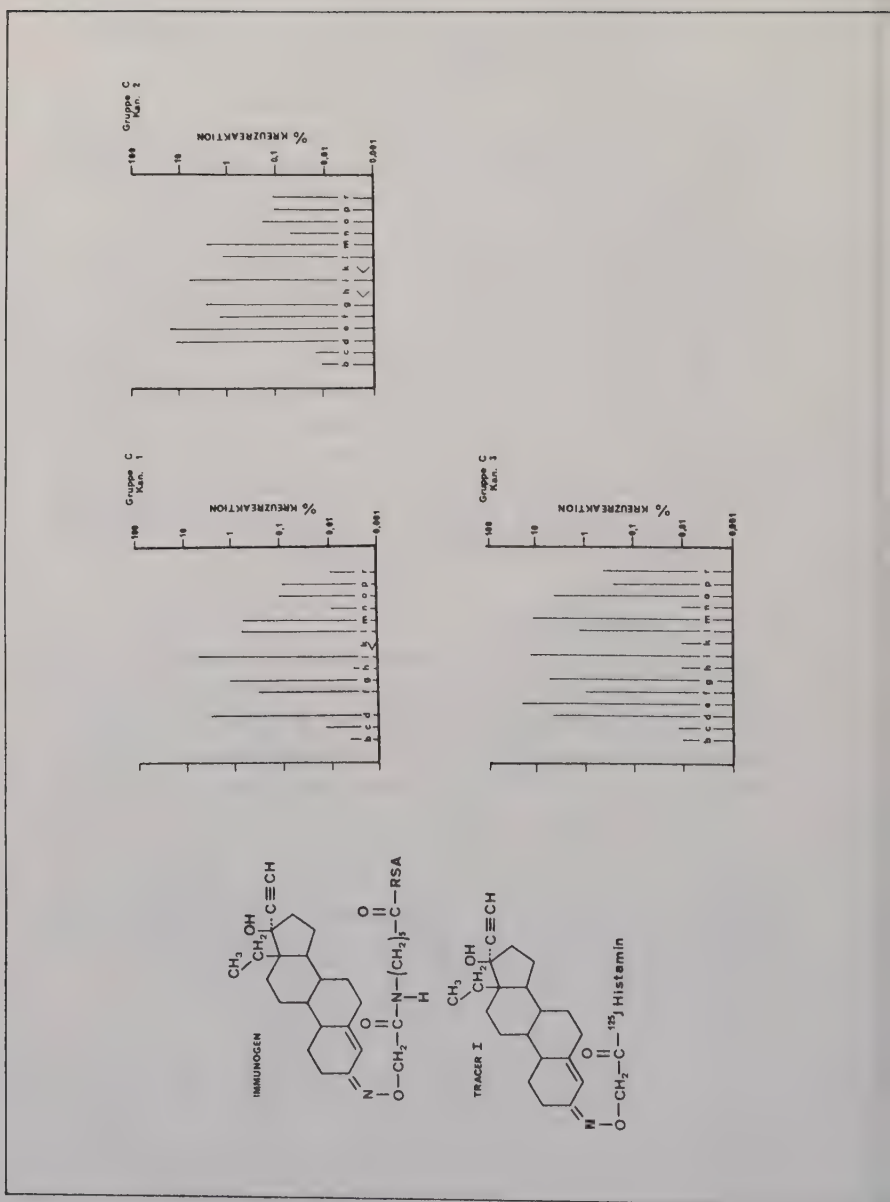
Abb. 23

3.3.1.3. Spezifität der Anti-D-Norgestrel-3-imminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Seren

Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 zusammengestellt. In der Gruppe C zeigt sich ein differenziertes Bild in den Kreuzreaktionen als bei den Gruppen A und B. Wieder fallen die niedrigen Reaktionen mit den L-Isomeren (b), den Estern (c, k) und mit Äthinylöstradiol (h) auf. Ebenso niedrig sind die Kreuzreaktionen mit 5d,3ß-Tetrahydro-Norethisteron (n). Unspezifischer, d.h. höher fallen die Reaktionen mit den Metaboliten 5α-Dihydro-D-Norgestrel, 5ß-Dihydro-D-Norgestrel und dem Äthinylnortestosteron (d,e,i) aus. Auffallend ist weiterhin, daß alle 5α-Metaboliten (d,f,l,n) niedrigere Kreuzreaktionen zeigen als die 5ß-Metaboliten (e,g,m,o). Diese, im Vergleich zu den anderen Gruppen, höhere Differenzierung der 5α- und 5ß-Metaboliten weist auf eine bessere Zugänglichkeit dieses Bereiches hin. Der durch die ε-Aminocapronsäure bewirkte Abstand des Steroids vom Protein könnte die Ursache sein.

3.3.1.4. Zusammenfassung

Um die Kreuzreaktionen der einzelnen Gruppen untereinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse der Antiseren zu einem mittleren Kreuzreaktionsspektrum graphisch zusammengefaßt (Abb. 25 a-c). Dabei wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sehr deutlich. Während die Gruppe B (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum) ein recht undifferenziertes Bild zeigte, unterschied die Gruppe A (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Serum) und in noch stärkeren Maße die Gruppe C (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum) zwischen den einzelnen Steroiden.


Gruppe C
Kan. 2
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r
Gruppe C
Kan. 1
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r
Gruppe C
Kan. 3
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r
IMMUNOGEN
CH3
OH
CH2
C≡CH
O
O—CH2—C—N—(CH2)5—C—RSA
H
TRACER I
O
O—CH2—C—125J Histamin

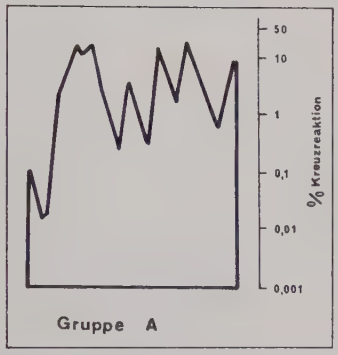


Abb. 25a

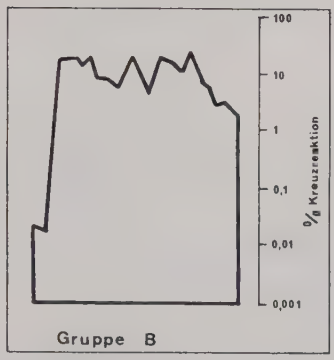


Abb. 25b

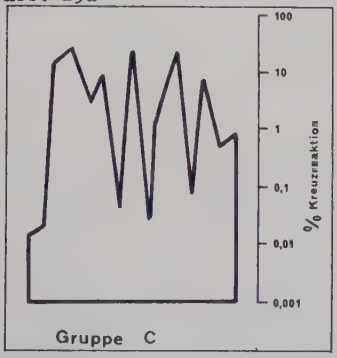


Abb. 25c

3.3.2. Vergleich der Kreuzreaktionen verschiedener Antiseren

3.3.2.1. Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Serum und Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum

Die Antiseren, denen die beiden Immunogen mit verschiedenen Trägerproteinen, humanes Immunglobulin G (Gruppe A) und Rinderserumalbumin (Gruppe B) zu Grunde lagen, zeigten eine niedrige Kreuzreaktion mit der L-Konfiguration des Norgestrels und dem D-Norgestrel-capronat (b,c). Unterschiede zwischen den beiden Antiseren fanden sich in den Kreuzreaktionen mit 5α-Dihydro-

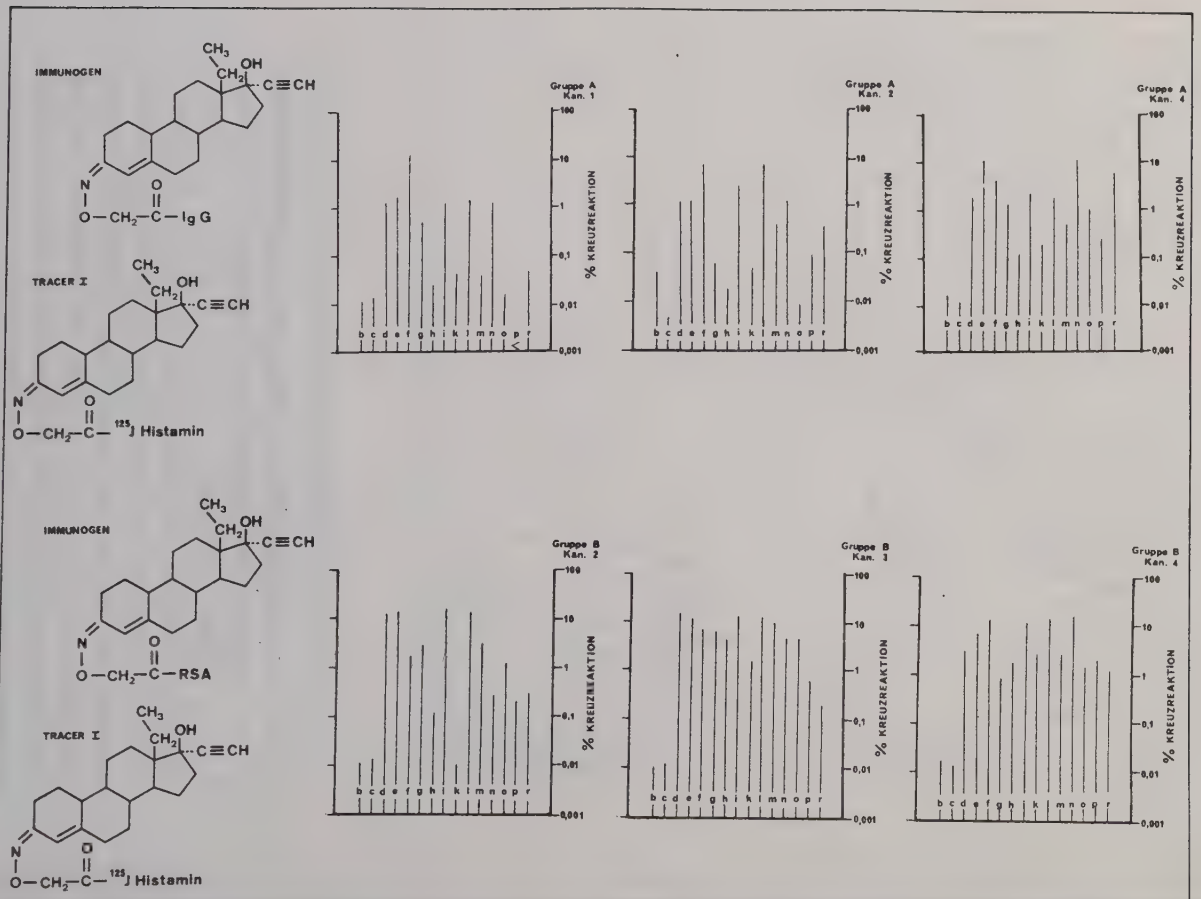

IMMUNOGEN
Ig G
TRACER I
^{125}J Histamin
IMMUNOGEN
RSA
TRACER I
^{125}J Histamin
Gruppe A Kan. 1
Gruppe A Kan. 2
Gruppe A Kan. 4
Gruppe B Kan. 2
Gruppe B Kan. 3
Gruppe B Kan. 4
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

Abb. 26

Norgestrel, 5ß-Dihydro-Norgestrel, sowie mit Äthinylnortestosteron und dessen 5α- bzw. 5ß-Dihydro-Metaboliten. In allen Fällen waren die Kreuzreaktionen mit den Seren der Tiere höher, die mit dem Rinderserumalbumin-Immunogen immunisiert worden waren. Die Antiseren der Tiere deren Immunogene als Trägerprotein das humane Immunglobulin G enthielten (mit dem grösseren Molekulargewicht = 150000) zeigten in den Kreuzreaktionen eine größere Spezifität. Unterschiede zwischen den 5α- und 5ß-dihydrierten Formen waren in beiden Fällen nicht zu erkennen. Besonders auffällig hoch waren die Kreuzreaktionen mit Äthinylöstradiol (Abb. 26).

3.3.2.2. Anti-D-Norgestrel-3-iminglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum und Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum

Wie bei den anderen Seren waren die Kreuzreaktionen mit L-Norgestrel und D-Norgestrel-capronat ebenfalls nur schwach. Extrem niedrige Reaktionen (<<0,001 %) wurden mit Äthinylöstradiol (h) und Norethisteron-önantat (k) erhalten, die sich beim Vergleich mit Serum B (Anti-D-NG-3-CMO-RSA) nicht fanden. Bei den Metaboliten des Norethisteron unterschieden sich die beiden Seren B und C in den Kreuzreaktionen von 5α-Dihydro-Norethisteron und 3α,5ß Tetrohydro-Norethisteron (1,0). Die Reaktionen mit Serum C (Anti-D-NG-3-CMO-ε-aminocapronyl-RSA-Serum) waren spezifischer. Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen Fehlen der angulären Methylgruppe (Kohlenstoffatom 19) und der ε-Aminocapronsäure-Brücke zwischen Hapten und Carrier-Protein vermuten. Dafür scheint die Stellung des Wasserstoffes in 5α-, bzw. 5ß-Position eine Rolle zu spielen, da auch die Kreuzreaktionen des Serums C mit 5α-Dihydro-Norgestrel (d) niedriger waren als die mit dem Serum B. Der Einfluß des Wasserstoffes an C_5 zeigte sich bei Serum C deutlich, die ß-Form ließ weit höhere Kreuzreaktionen zu (Abb. 27).

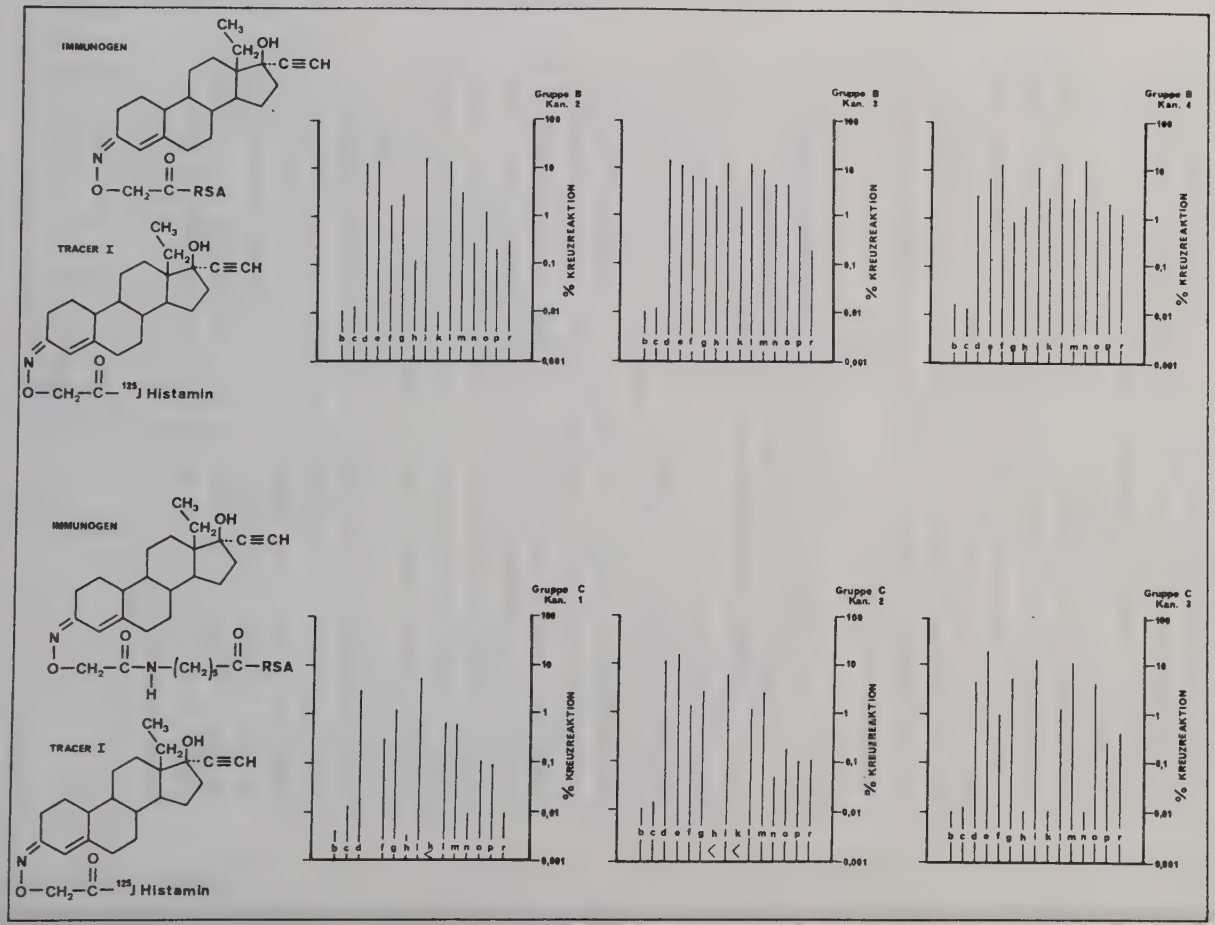

IMMUNOGEN
TRACER I
^{125}J Histamin
Gruppe B Kan. 2
Gruppe B Kan. 3
Gruppe B Kan. 4
Gruppe C Kan. 1
Gruppe C Kan. 2
Gruppe C Kan. 3
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

Abb. 27

3.3.3. Vergleiche der Kreuzreaktionen bei Verwendung verschiedener Tracer (Tracer I und II)

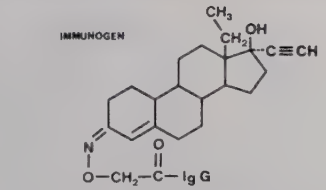
Beim Vergleich der Reaktionen beider Tracer zeigte sich bei Serum A (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Serum) mit dem Tracer II (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ϵ-aminocapronyl-^{125}jodhistamin) ein Spezifitätsabfall. Die Kreuzreaktionen mit den Steroiden L-Norgestrel, 3α,5ß-Tetrahydro-Norgestrel, Äthinylöstradiol, 19-Nortestosteron (b,g,h,r) waren ebenso wie bei den Versuchen mit Tracer I (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin) niedriger als die mit den übrigen Substanzen (Abb. 28).

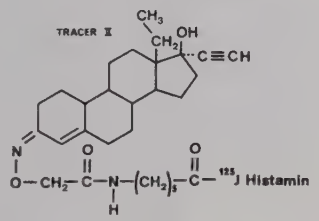
Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum

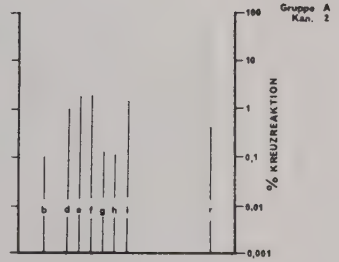
Die Kreuzreaktionen mit 5α-Dihydro-Norgestrel (d) waren bei den Antiseren der beiden Versuchstiere niedriger als die entsprechenden Werte mit Tracer I (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin). Eine deutliche Differenz fand sich zwischen 5α- und 5ß-Form des Norgestrels, die ß-Konfiguration reagierte mit dem Antiserum des Versuchstieres Nr. 3 wesentlich unspezifischer. Ein anderes Bild wurde mit Antiserum 4 erhalten, da mit Tracer I (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin) die ß-Stellung des Wasserstoffes keine krassen Kreuzreaktionsunterschiede zeigte (Steroide d,e). Ein Unterschied zwischen α- und ß-Konfiguration wurde erst wieder zwischen 3ß,5α-Tetrahydro-Norgestrel und 3α,5ß-Tetrahydro-Norgestrel (f,g) deutlich (Abb. 29).

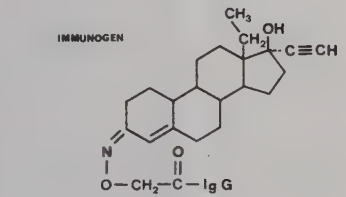
Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ϵ-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum

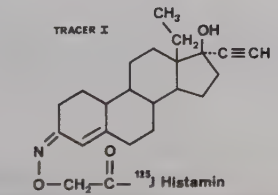
Allgemein ist zu beobachten, daß sich der schon im Tracer I (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin) deutlich festzustellender Unterschied zwischen α- und ß-Formen bei Anwendung von Tracer II (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ϵ-aminocapronyl-^{125}jodhistamin) noch verstärkt (Steroide d,f,g,h) (Abb. 30).


IMMUNOGEN
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—Ig G


TRACER II
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—N—(CH2)5—C—125J Histamin
H


Gruppe A
Kan. 2
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b d e f g h i r


IMMUNOGEN
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—Ig G


TRACER I
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—125J Histamin

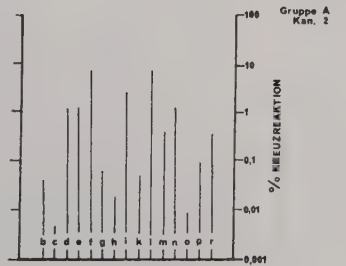
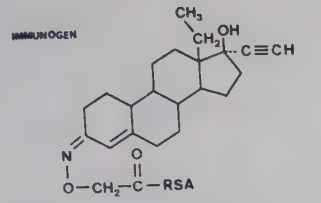
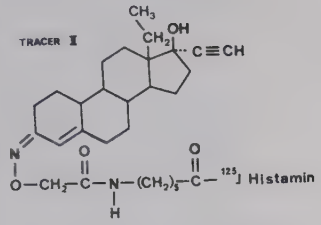
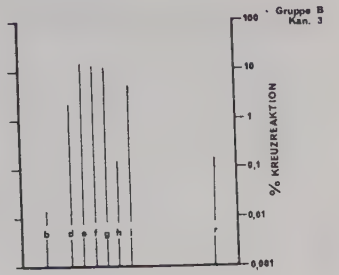
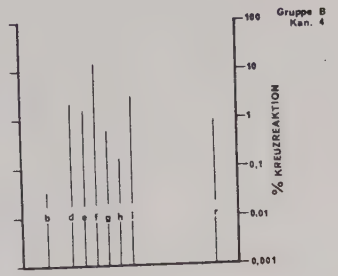

Gruppe A
Kan. 2
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o r

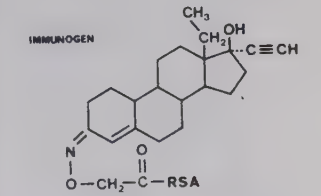
Abb. 28

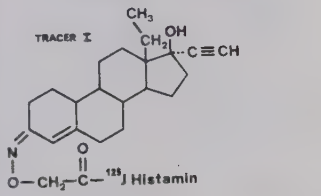

IMMUNOGEN
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—RSA

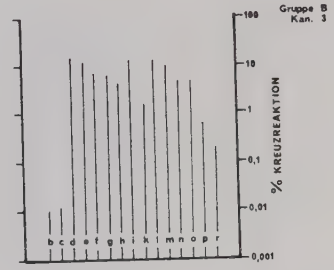

TRACER II
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—N—(CH2)5—C—125J Histamin
H


Gruppe B
Kan. 3
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b d e f g h i r


Gruppe B
Kan. 4
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b d e f g h i r


IMMUNOGEN
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—RSA


TRACER I
CH3
CH2
OH
C≡CH
N
O
O—CH2—C—125J Histamin


Gruppe B
Kan. 3
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

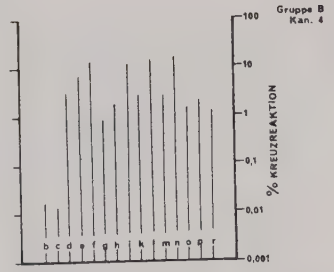
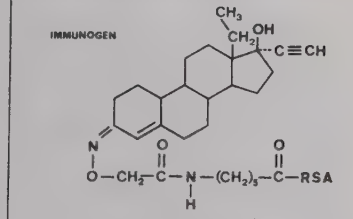
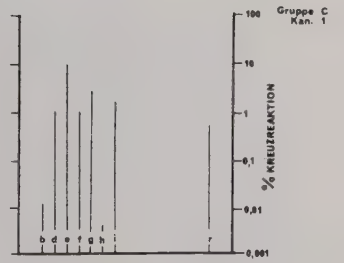
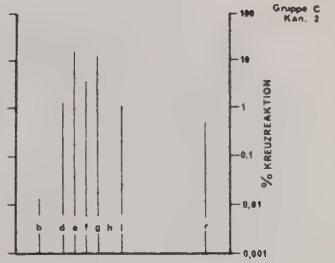
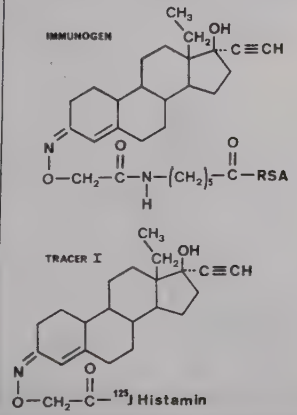

Gruppe B
Kan. 4
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

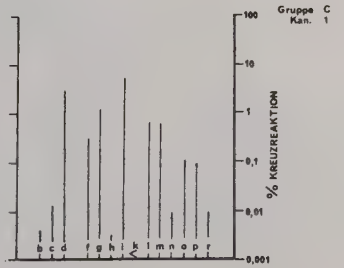
Abb. 29


IMMUNOGEN
TRACER II
^{125}J Histamin


Gruppe C
Kan. 1
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b d e f g h i r


Gruppe C
Kan. 2
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b d e f g h i r


IMMUNOGEN
TRACER I
^{125}J Histamin


Gruppe C
Kan. 1
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d f g h i k l m n o p r

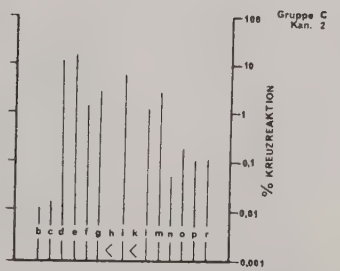

Gruppe C
Kan. 2
% KREUZREAKTION
100
10
1
0,1
0,01
0,001
b c d e f g h i k l m n o p r

Abb. 30

Zusammenfassung

Das Spektrum der Kreuzreaktionen der einzelnen Gruppen in gleicher Weise wie auf Seite 40 graphisch dargestellt, zeigte keine krassen Unterschiede bei der Verwendung von Tracer II (Abb. 31 a-c).

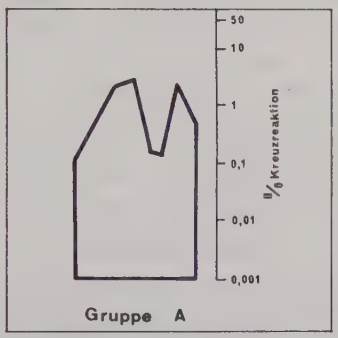


Abb. 31a

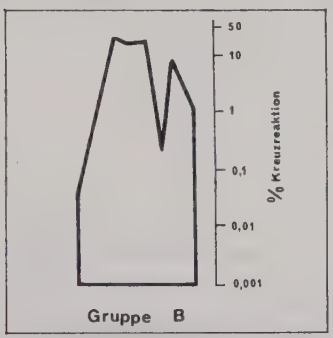


Abb. 31b

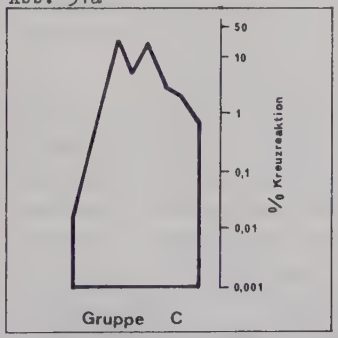


Abb. 31c

3.3.4. Vergleiche zwischen Kreuzreaktionen dreimal, bzw. sechsmal geboosteter Tiere (Antiseren)

Beim Vergleich von Antiseren sechsmal geboosterter Versuchstiere mit denen von dreimal geboosterten zeigte sich, wie auch schon mit Tracer I (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin), daß die Spezifität der Seren abgenommen hat, die Kreuzreaktionen mit dem um die ε-Aminocapronsäure verlängerten Tracer II waren auch alle größer. (Abb. 32)

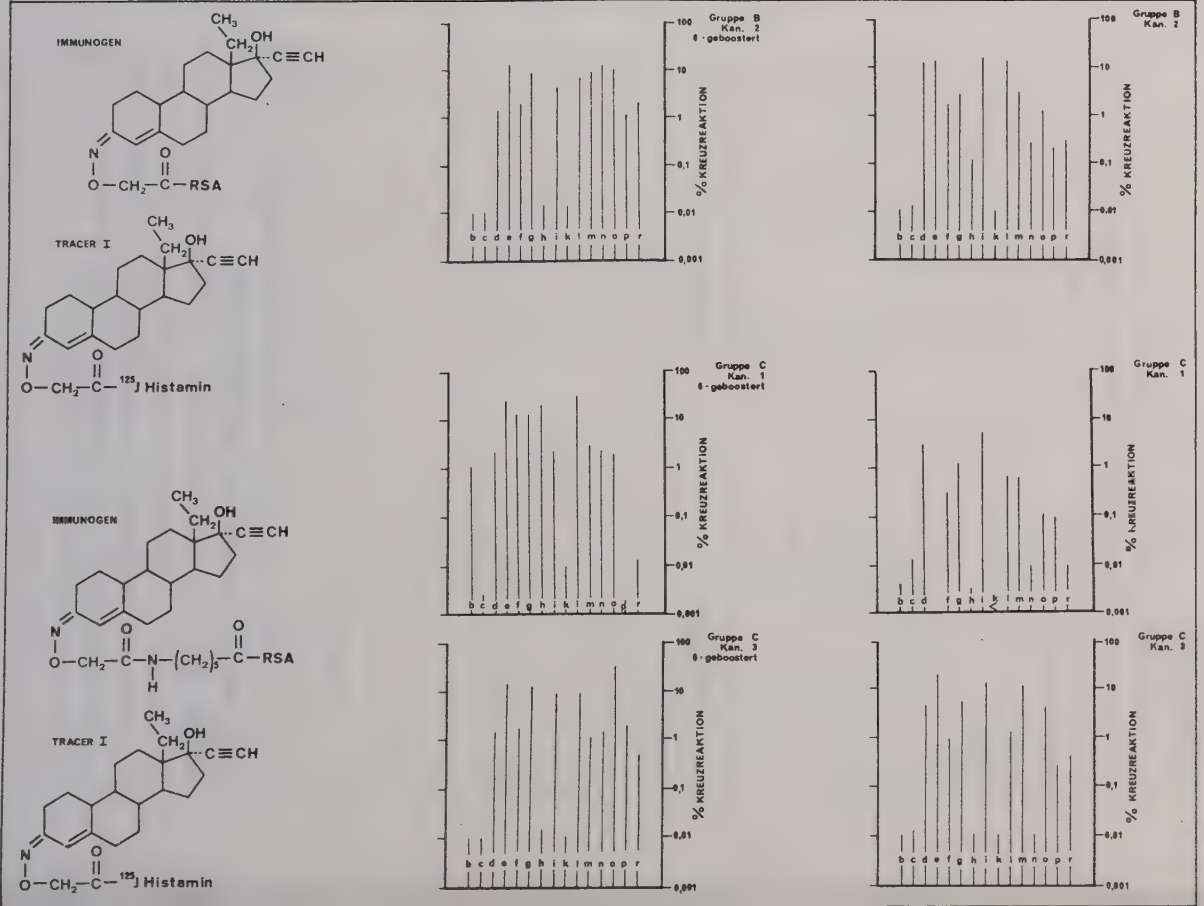

IMMUNOGEN
TRACER I
^{125}J Histamin
IMMUNOGEN
TRACER I
^{125}J Histamin
Gruppe B Kan. 2 6 · geboostert
Gruppe B Kan. 2
Gruppe C Kan. 1 6 · geboostert
Gruppe C Kan. 1
Gruppe C Kan. 3 6 · geboostert
Gruppe C Kan. 3
% KREUZREAKTION
b c d e f g h i k l m n o p r

Abb. 32

3.4. Schlußfolgerung und Zusammenfassung:

Im Rahmen des Radioimmunotestes wurde am Beispiel eines Steroides, dem synthetischen Gestagen D-Norgestrel (D-17ß-hydroxy-18-methyl-17α-äthinyl-4-östren-3-on), der Einfluß verschiedener Immunogene auf die Spezifität der eingesetzten Antiseren untersucht. Außerdem wurden alle Untersuchungen mit 2 verschiedenen Tracer durchgeführt (1. D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-^{125}jodhistamin und 2. D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-^{125}jodhistamin).

Folgende Antiseren wurden hergestellt:

A. Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-humanes Immunglobulin G-Serum (A-D-NG-3-CMO-hIgG-S)

B. Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum (A-D-NG-3-CMO-RSA-S)

C. Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum (A-D-NG-3-CMO-ε-Acap-RSA-S)

Alle Versuche wurden mit Antiseren verschieden oft geboosterter Tiere (3malige und 6malige Boosterung) durchgeführt. Bei der Untersuchung des Titers (Feststellung des Sättigungbereiches) zeigte das Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum (B) den höchsten Wert gefolgt vom Antiserum C (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum) und A (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Serum). Die Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang mit der an das Trägerprotein gekuppelten Anzahl vom hormonellen Haptenen und einem großen (hohen) Titer hin. Antiserum B enthielt die meisten Haptene, entsprechend weniger die Antiseren C und A. Mit den Antiseren 6mal geboosteter Tiere ließen sich keine weiteren Titeranstiegemehr erzielen.

Bei der Austestung der Spezifität der einzelnen Antiseren, d.h. in den Kreuzreaktionen zeigten sich grundsätzliche Unterschiede. So reagierte Antiserum C (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum) mit den strukturähnlichen Steroiden recht stark und spezifisch, während die Anti-

seren A und B (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Immunglobulin G-Serum, bzw. Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-Rinderserumalbumin-Serum) jeweils ein weniger differenzierteres Bild boten. Es scheint, daß das Immunogen als Ganzes doch einen weit größeren Einfluß auf die Spezifität der Antikörper besitzt als zum Beispiel die hochmolekularen Trägerproteine, die mit ihrem großen Molekulargewicht die Immunogenität prägen.

Im einzelnen zeigten die Vergleiche zwischen Antiseren, denen unterschiedliche Trägerproteine (Antiserum A = humanes Immunglobulin G = MG 150 000 / Antiserum B = Rinderserumalbumin = MG 67 000) zugrunde lagen, eine größere Spezifität der Antiseren, die durch das entsprechend höhermolekulare Immunogen provoziert waren. Der Einsatz von zwei verschiedenen Tracers, die sich durch ein ε-Aminocapronat-Verbindungsstück unterschieden, zeigte nur geringe Unterschiede. So konnte bei Verwendung von Tracer II (D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-^{125}jodhistamin) im Radioimmunotest ein leichter Titeranstieg des analogen Antiserums C (Anti-D-Norgestrel-3-iminoglycolyl-ε-aminocapronyl-Rinderserumalbumin-Serum) beobachtet werden. Die Kreuzreaktionen mit den Antiseren der 6mal geboosterten Tiere zeigten alle einen krassen Spezifitätsabfall.

Literaturhinweise

1. Abraham, G.E. — Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17ß
J. Clin. Endocrinol. 29 (1969) 866

2. Abraham, G.E.
Swerdloff, R.
Tulchinsky, D.
Odell, W.D. — Radioimmunoassay of plasma progesterone
J. Clin. Endocrinol. 32 (1971) 619

3. Brandis, H. — Einführung in die Immunologie
Gustav-Fischer Verlag, Uni Taschenbücher 138 (1972)

4. Daughaday, W.H.
Jacobs, L.S. — Methods of separating antibody-bound from free antigen. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott Philadelphia (1971) 303

5. Donald, R.A. — Application of the coated charcoal separation method to the radioimmunoassay of plasma corticotrophin
J. Endocrinol. 41 (1968) 499

6. Ekins, R.
Newman, B. — Theoretical aspects of saturation analysis
Acta Endocrinol. 147 (1970) 11

7. Erlanger, B.F.
Borek, F.
Beiser, S.M.
Lieberman, S. — Steroid-protein conjugates
I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone
J. Biol. Chem. 228 (1957) 713
II. Preparation and characterization of conjugates of bovin serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone
J. Biol. Chem. 234 (1959) 1090

8. Felber, J.P.
Aubert, M.L.
Radioimmunoassays. General principles
J. Nucl. Biol. Med. 13 (1969) 1

9. Freund, J.
The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization
Amer. J. Clin. Pathol. 21 (1951) 645

10. Furuyama, S.
Nugent, C.A.
A radioimmunoassay for plasma progesterone
Steroids 17 (1971) 663

11. Greenwood, F.C.
Radioiodination of peptide hormones: Procedures and problems. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott Philadelphia (1971) 288

12. Guy, E.A.
Grover, P.K.
Covalent linkage of hormonal haptens (and of steroid hormones) to protein carriers for use in radioimmunoassay. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 134-157

13. Habeeb, A.F.S.A.
Aminogruppenbestimmung
Analyt. Biochem. 14 (1966) 328

14. Herbert, V.
Coated charcoal separation of free labelled hormone from hormone bound to antibody
Proceedings, International Symposium on Proteins and Polypeptide Hormones
Excerpta Medica, Amsterdam (1969)

15. Kabat, E.A.
Einführung in die Immunchemie und Immunologie
Springer Verlag, Heidelberger Taschenbücher 79 (1971)

16. Maurer, H.R.
Disc-Elektrophoresis and related techniques of polyacrylamid gel elektrophoresis
Walter de Gruyter 1971

17. Nars, P.W.
Hunter, W.M.
A method for labelling oestradiol-17ß with radioiodine for radioimmunoassays
Proceedings of the Society for Endocrinology (Abstract) (1973), xlvii

18. Niswender, G.D.
Midgley, A.R., Jr.
Hapten radioimmunoassay for steroid hormones
Immunologic Methods in Steroid Determination
Appleton-Century-Crofts, New York (1970)

19. Nossal, G.J.V.
Antikörper und Immunität
Suhrkamp Taschenbuch 44 (1972)

20. Odell, W.D.
Abraham, W.R.
Skowsky, W.R.
Hescox, M.A.
Fisher, D.A.
Production of antisera for radioimmunoassays. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 57

21. Palmieri, G.M.A.
Yalow, R.S.
Berson, S.A.
Adsorbent techniques for the separation of antibody-bound from free peptide hormones in radioimmunoassay
Horm. Metab. Res. 3 (1971) 301

22. Parker, C.W.
Nature of immunological responses and antigen-antibody interaction. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 25

23. Pickering, B.T.
Radioimmunoassay of synthetic progestins in plasma
J. Endocrinol. 61,2 (1974) X

24. Pierce, J.G.
Considerations of polypeptide purification. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 354

25. Raspé, G.
Schering workshop on steroid hormone receptors
Advances in the Biosciences 7 (1970); Pergamon Press, Oxford

26. Rodbard, D.
Catt, K.J.
Mathematical theory of radioligand assays: The kinetics of separation of bound from free
J. Steroid Biochem. 3 (1972) 255

27. Stanczyk, F.R.
Hiroi, M.
Goebelsmann, U.
Brenner, P.F.
Lumkin, M.E.
Mishell, D.R., Jr.
Radioimmunoassay of serum d-norgestrel in women following oral and intravaginal administration
Contraception 12,3 (1975) 279

28. Vaitukaitis, J.
Robbins, J.B.
Nieschlag, E.
Ross, G.T.
A method for producing specific antisera with small doses of immunogen
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 (1971) 988

29. Vetter, W.
Armbruster, H.
Tschudi, B.
Vetter, H.
Production of antisera specific to aldosteron: Effects of hapten density and of carrier proteins
Steroids Vol. 23, 5 (1974) 741

30. de Villa, G.O., Jr.
Roberts, K.
Wiest, W.G.
Mikhail, G.
Flickinger, G.A.
A specific radioimmunoassay of plasma progesterone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35 (1972) 458

31. Waren, R.J.
Fotherby, K.
Radioimmunoassay of synthetic progesterone, norethisterone and norgestrel
J. Endocrinol. 62 (1974) 1

32. Weir, D.M.
Immunologie für Studierende und Ärzte
F.K. Schattauer Verlag, Uni Taschenbücher 182 (1973)

33. Wiest, W.G.
Rao, B.R.
Progesterone binding proteins in rabbit uterus and human endometrium. In Schering workshop on steroid hormone receptors
Advances in the Biosciences 7 (1970) 251; Pergamon Press, Oxford

34. Yalow, R.S.
Berson, S.A.
Problems of validation of radioimmunoassay. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 374

35. Yalow, R.S.
Berson, S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1157

56. Yalow, R.S.
Berson, S.A. Introduction and general considerations. In Principles of competitive protein-binding assays; Odell, W.D. and Daughaday, W.H.; Lippincott, Philadelphia (1971) 1

L e b e n s l a u f

Am 27. Oktober 1950 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Heinz Beyer und dessen Ehefrau Eva Beyer in Berlin-Charlottenburg geboren. Von 1957 bis 1970 besuchte ich die Grund- und Oberschule in Berlin und bestand im Januar 1970 am Gottfried-Keller-Gymnasium meine Reifeprüfung. Im Sommersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Germanistik und Biologie an der Technischen Universität Berlin und wechselte im Wintersemester auf die Freie Universität Berlin, um das Studium der Humanmedizin aufzunehmen. Im August 1971 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und bestand im März 1973 meine ärztliche Vorprüfung. Den klinischen Teil des Studiums habe ich wechselnd im Klinikum Steglitz und Westend der Freien Universität Berlin absolviert, am 6. August 1976 bestand ich meine ärztliche Prüfung. Im Wintersemester 1973 begann ich mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in den Forschungslaboratorien der Schering AG Berlin/Bergkamen.

F. Höpfner - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198